

Die Bedeutung der inneren plexiformen Schicht in der Retinogenese: Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Gesine Bachmann
aus Tübingen

Berichterstatter: Prof. Dr. Paul G. Layer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bodo Laube

Tag der Einreichung: 28. Oktober 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 2012

Darmstadt 2012

D 17

Inhalt

Danksagung	1
Abkürzungsverzeichnis	2
Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	8
1. Einleitung	9
1.1 Der Hühnerembryo: Ein Modell für retinale Zelldifferenzierung	9
1.1.1 Entwicklung der Retina.....	9
IPL-Bildung und OPL-Bildung	12
1.1.2 Aufbau der adulten Retina.....	13
1.1.3 Spezielle Zelltypen der Retina.....	15
1.1.3.1 Amakrinzellen.....	15
Cholinerge Amakrinzellen	15
1.1.3.2 Müllergliazellen.....	17
1.1.3.3 Photorezeptoren.....	18
1.2 Glutamat.....	20
1.2.1 Glutamatrezeptoren.....	21
1.3 Retinosphäroide als dreidimensionales <i>in-vitro</i> Modell	24
Rosettensphäroide	25
2. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Chemikalien.....	29
3.1.2 Aggregationsmedium und Zusätze.....	29
3.1.3 Puffer und Medienzusammensetzung.....	30
3.1.4 Antikörper	31
3.1.5 Primer	32
3.1.6 Reaktionsansätze	32
3.1.7 Enzyme	33
3.1.8 Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.9 Versuchstiere	33
3.1.10 Geräte	33
3.1.11 Software	34
3.2 Methoden	35
3.2.1 Herstellung von Rosettensphäroiden	35
3.2.2 Kultivierung und Behandlung von Rosettensphäroiden	36
3.2.2.1 Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801	37
3.2.3 Fixierung und Herstellung von Gefrierschnitten	37
3.2.4 Immunhistochemie	38
Einfach- und Doppelfärbungen.....	39
3.2.5 Proliferationsnachweis mittels BrdU-Einbau	42

3.2.6	Apoptosenachweis mit Hilfe der TUNEL- Methode	42
3.2.7	Cholinesterase-Reaktion nach Karnovsky und Roots	42
3.2.8	Herstellung von Homogenaten für die Proteinchemie	43
3.2.9	Proteinbestimmung nach Bradford	43
3.2.10	Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität mit dem Elman-Assay	44
3.2.11	Ernten von Sphäroiden für eine RNA-Isolierung	44
3.3.12	Isolierung der Gesamt-RNA	45
	TRI-Reagent® - RNA / DNA / Protein Isolation Reagent	45
	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	45
3.2.13	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	46
	RT-Reaktion	46
	PCR-Amplifikation	47
3.2.14	Dokumentation und Bildbearbeitung	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Entwicklung der Rosettensphäroide in Abhängigkeit vom Alter der embryonalen Retina	49
4.1.1	Morphologische Unterschiede in der Rosettensphäroid-Entwicklung	49
4.1.2	Entwicklung der Visinin und Calretinin-Expression in Rosetten- sphäroiden aus Retinae 5 oder 6 Tage alter Embryonen im Laufe der Kultivierung	53
4.2	Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden	58
4.2.1	Morphologische Unterschiede der Rosettensphäroide nach der Glutamatbehandlung	58
4.2.1.1	Abgerundete Sphäroide und reduzierte IPL-Beulen durch Glutamatbehandlung	58
4.2.1.2	Zirkularität.....	63
4.2.2	Die Proliferation wird am Kulturtag 8 und 8 durch Glutamat signifikant erhöht	64
4.2.3	Apoptose (TUNEL)	67
4.2.4	Verringerung der cholinergen Amakrinzellen in der INL durch Glutamat- behandlung.....	68
4.2.4.2	Die mRNA-Expression der Cholinacetyltransferase der Glutamat- behandelten Rosettensphäroide ist reduziert.....	70
4.2.4.3	Die AChE-positive Amakrinzellpopulation ist in behandelten Sphäroiden verringert.....	72
4.2.5.	Histochemischer Nachweis der Acetylcholinesterase mit der Methode nach Karnovsky/Roots (1964).....	74
4.2.5.1	Die AChE-Aktivität in Glutamat-behandelten Rosettensphäroidkulturen ist geringer.....	78
4.2.5.2	Die mRNA-Expression der AChE der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide ist reduziert.....	78
4.2.6	Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden führt zu reduzierten IPL und INL-Bereichen	80
4.2.6.1	Darstellung der Amakrinzellen der INL und der inneren Zellen der IPL mittels 6, Calretinin und Islet-1 Pax-6	80
	Pax-6	80
	Calretinin und Islet-1	83

4.2.6.2	Axonin-1-Expression als Marker für IPL-Stratifizierung	89
4.2.6.3	Die Stratifizierung der IPL charakterisiert durch ChAT / CRABP fehlt in Glutamatbehandelten Rosettensphäroiden	91
4.2.7	Die Müllergliazellen zeigen eine veränderte Zellmorphologie unter Glutamatbehandlung	93
4.2.8	Äußere Retina: Die Anzahl der Photorezeptoren in den Rosettensphäroiden wird durch die Glutamatbehandlung erhöht	96
4.2.8.1	Glutamat erhöht die mRNA-Expression von Opsin und Rhodopsin	106
4.2.8.2	Das vorübergehende ‚Targeting‘ der Photorezeptoren in die IPL ist durch die Glutamatbehandlung gestört	109
4.2.9	NMDA - Behandlung der Rosettensphäroide	111
4.2.10	Glutamatrezeptoren: Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801	113
5.	Diskussion	116
5.1	Verschiedene Zelllinien sind verantwortlich für die unterschiedlichen Rosettensphäroidtypen aus verschieden alter embryonaler Retina	116
5.2	Neurotoxizität von Glutamat	119
5.3	Teilweises Entfernen (Ablation) der cholinergen Amakrinzellpopulation in der INL	119
5.3.1	Innere IPL- Zellen und cholinerge Amakrinzellsubpopulation: Charakterisierung der zentralen IPL-Zellen im Rosettensphäroid	122
5.4	AChE-Aktivität wird durch Glutamat stark reduziert	123
5.5	Stark reduzierte IPL und INL-Bereiche im Rosettensphäroid durch Glutamat	124
5.5.1	Entwicklung der inneren plexiformen Schicht ist durch Glutamatbehandlung gestört: Stratifizierung der IPL fehlt	125
5.5.2	Anzahl der zentralen Zellen in der IPL ist stark reduziert	126
5.6	Fehlendes Müllergliaskelett in Glutamatbehandelten Rosettensphäroiden	126
5.7	In den unorganisierten Bereichen der Rosettensphäroide wird die Anzahl der Photorezeptoren durch die Glutamatbehandlung erhöht	127
5.7.1	Transiente Projektionen der Photorezeptoren in die IPL-Bereiche der Rosettensphäroide, werden durch Glutamat-Behandlung gestört	129
5.7.2	Retinosphäroide als 3D- <i>in vitro</i> -Modellsystem zur Untersuchung der Plastizität von Photorezeptoren in ihrer Entwicklung	131
5.8	Erhöhte Proliferation in den unorganisierten Bereichen	132
5.9	Glutamat wirkt hier über den NMDA-Rezeptor	133
6.	Zusammenfassung	135
7.	Literatur	137

Danksagung

Durch den langen Zeitraum meiner Mitarbeit und Promotion in der Arbeitsgruppe Layer hatte ich die seltene Möglichkeit, dieses besondere ‚Biotop‘ auf mich wirken zu lassen und dessen Entwicklung über einen längeren Zeitraum zu studieren und verstehen zu lernen. Deshalb möchte ich den vielen Menschen danken, die mir in dieser Zeit begegnet sind, mich unterstützt und mich über eine längere oder kürzere Zeit begleitet haben.

Als erstes gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Paul G. Layer für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, den Wiedereinstieg in die Forschung und seine stetige Diskussionsbereitschaft und konstruktives Interesse gegenüber dieser Arbeit. Sowohl die guten Arbeitsbedingungen als auch das Verständnis hinsichtlich der Doppelbelastung Familie und Arbeit sind einzigartig.

Die besondere Atmosphäre dieser Arbeitsgruppe wird durch die Fähigkeit Herrn Layers ermöglicht einer interessanten Mischung von Mitarbeitern aus aller Welt die Zusammenarbeit zu ermöglichen. Dies sowohl im Labor, wie auch bei den vielen privaten Einladungen und Feiern im Hause Layer. Hierbei einen herzlichen Dank an Kristiana Layer, die mit großer Unterstützung zur guten Arbeitsatmosphäre beigetragen hat.

Herrn Professor Dr. Bodo Laube danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Vor allem möchte ich den Stützen des Labors, den technischen Mitarbeiterinnen danken. Jutta Smidek-Huhn als immer gut aufgelegte Organisatorin des Laborbetriebs und ‚Karnovsky‘-Chefin, Ulrike Hoppe mit den genauesten Geräteanleitungen und Fotomeisterin, Meike Stotz-Reimers als immer freundliche, hilfsbereite Färbemeisterin und Michaela Becker-Röck, die schneller am Computer arbeitet als ihr Schatten und als harte Kritikerin. Ohne eure Hilfe und Freundschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die gute Einführung ins Reich der Sphäroide und des Laborbasiswissens danke ich Herrn Elmar Willbold mit seiner ruhigen und geduldigen Art. Herzlich danken möchte ich auch den sogenannten ‚Sphäroidologen‘ der letzten Jahre, wie Florian Frohns als ‚Image J-Chef‘, Katja Eberhardt, Jenny Haas, Alexander Greif und Gopenath Thangaraj.

Gopenath Thangaraj als Forschungspartner des Glutamat-Adipat-Projekts und ‚König der PCR’s‘ gilt ein besonderer Dank hinsichtlich der angenehmen und motivierenden Zusammenarbeit.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Astrid Vogel-Höpker, Janine Klaczinski (als ‚Exel-Queen‘), Jörg Steinfeld, Laura E. Sperling und Anja Heselich. Ebenso danke ich Herrn Wolfgang Schäfer, dem Sekretariats-Mikroskop-Service-Bienen-Manager.

In Erinnerung bleiben auch viele Mitarbeiter, die den Laboralltag in all den Jahren durch die hilfreiche Zusammenarbeit und zum Teil auch Dank ihres großen Unterhaltungswertes bereichert haben: Andrée Rothermel, Bernhard Pelzer, Afrim Bytygi, Henny Walter, Anja Trautmann, Andrea Busch, Heike Hardt, Michaela Bauer, Beatrice Blanco, Karla Allebrandt, Matthias Rieke, Ehepaar Steinemann, Jacques Paysan und Peter Andermann.

Abschließend danke ich natürlich auch meiner Familie, die mich zum manchmal aufregenden Laboralltag mit neuen Aufgaben und Aufregungen wieder in ein anderes Universum gebracht hat.



Aus Wilhelm Busch: Max und Moritz

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CS	<i>chicken serum</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
Cy2	Carbocyanin 2
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4, 6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	<i>Dulbeco's modified Eagle's medium</i>
DNase	Desoxyribonuklease
E	Embryonaltag
et al.	und andere
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganlion cell layer</i>)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
ILM	Innere limitierende Membran (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	Innere nukleäre Schicht (<i>inner nuclear layer</i>)
K	Kulturtag
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M	Molar

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaAcetat	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OLM	äußere limitierende Membran (<i>outer limiting membrane</i>)
ONL	äußere nukleäre Schicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
OT	Objektträger
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered salt solution</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>pons Hydrogenium</i>
RNase	Ribonuklease
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin <u>n</u>ick <u>e</u>nd <u>l</u>abeling</i>
u.a.	unter anderem
UV	Ultra-Violett
u.v.	unverdünnt
U	Units
ü. N.	über Nacht

Abbildungsverzeichnis:

1. Einleitung:

Abbildung 1:	Strukturelle Organisation der sich entwickelnden und adulten Wirbeltierretina	10
Abbildung 2:	Laminierung der Retina	11
Abbildung 3:	Organisation der Wirbeltierretina.....	14
Abbildung 4:	<i>In-vivo</i> Retina E10: Typ I und Typ II cholinerg Amakrinzellen (Islet-1, DAPI).....	16
Abbildung 5:	<i>in-vivo</i> Retina E 11: Cholinerge Amakrinzellen Typ I und II (Islet-1, ChAT, Pax-6, DAPI)	16
Abbildung 6:	Vertikale Ansicht einer Golgi gefärbten Müllergliazelle	17
Abbildung 7:	Zapfen, Huhn.....	18
Abbildung 8:	Retinaaufbau	18
Abbildung 9:	L-Glutaminsäure, Strukturformel Glutaminsäure	20
Abbildung 10:	Ionotrope Glutamatrezeptoren	23
Abbildung 11:	Rosettensphäroide Kulturtag 8	25
Abbildung 12:	IPL-Bereiche im Rosettensphäroid.....	26

2. Material und Methoden

Abbildung 13:	Schematische Darstellung einer Antikörperfärbung	38
---------------	--	----

3. Ergebnisse

Abbildung 14:	Rosettensphäroide in der Kulturschale	50
Abbildung 15:	Kryostatschnitte von Rosettensphäroiden mit DAPI gefärbt	50
Abbildung 16:	Die Rosettensphäroide aus den Retinae 5 Tage alter Embryonen werden von plexiformen Schichten dominiert.....	51
Abbildung 17:	Die Rosettensphäroide aus den Retinae 6 Tage alter Embryonen werden von Rosetten dominiert.....	52
Abbildung 18:	Verhältnis der Fläche der plexiformen Bereiche zur Gesamtsphäroidfläche	52
Abbildung 19:	Verhältnis der Fläche der Rosetten zur Gesamtsphäroidfläche	53
Abbildung 20:	Bildung einer Horizontalzellschicht in E6-Retina-Sphäroiden	55

Abbildung 21:	Entwicklung der Visinin- und Calretinin-Expression in Rosettensphäroiden aus Retinae 5 Tage alter Embryonen im Laufe der Kultivierung.....	56
Abbildung 22:	Entwicklung der Visinin- und Calretinin Expression in Rosettensphäroiden aus Retinae 6 Tage alter Embryonen	57
Abbildung 23:	Unterschiedlich verbrauchtes Medium in den Kulturschalen an Kulturtag 8	58
Abbildung 24:	Morphologische Unterschiede zwischen Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden und nicht behandelten Proben an Kulturtag 6, 8 und 10 in der Kulturschale	59
Abbildung 25:	Zunehmende Reduktion der inneren plexiformen Bereiche bei Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden während der Kultivierung.....	60
Abbildung 26:	Prozentualer Anteil der IPL-Bereiche an der Gesamtsphäroidfläche	62
Abbildung 27:	Die Zirkularität der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide ist an Kulturtag 6 und 8 signifikant höher als in den Kontrollen	63
Abbildung 28:	Erhöhte Proliferation in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtag 6 und 8	65
Abbildung 29:	Anzahl der proliferierenden Zellen in Kontrollen und behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtag 6 und 8	66
Abbildung 30:	Apoptose ist in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden unverändert	67
Abbildung 31:	Entstehung der Subbanden in der IPL durch die Fortsätze von ChAT und 3D10-positiven Amakrinzellen von Kulturtag 4 bis 8	70
Abbildung 32:	Reduktion der Calretinin und 3D10-positiven Amakrinzellen unter Glutamatbehandlung an Kulturtag 8.....	71
Abbildung 33:	Reduktion der AChE-Aktivität in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden	73
Abbildung 34:	Nachweis der AChE- Aktivität an Kulturtag 8 in Kontrollen, 0,2 mM und 0,4 mM Glutaminsäure-behandelten Sphäroiden.....	76
Abbildung 35:	AChE- positive Projektionen in die INL	77
Abbildung 36:	AChE-Aktivität an Kulturtag 6, 8, 10 in Glutamat-behandelten Proben und Kontrollen.....	77
Abbildung 37:	Temporale mRNA-Expression von AChE an den Kulturtagen 6, 8 und 10 von Kontrollen und Glutamat-behandelten Proben	78

Abbildung 38:	Temporale mRNA-Expression von ChAT den Kulturtagen 6, 8 und 10 von Kontrollen und Glutamat-behandelten Proben	78
Abbildung 39:	Entwicklung der Pax 6-Expression in Kontrollen und Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtage 6,8,10	81
Abbildung 40:	Pax-6-positive Zellen in der INL und der IPL sind in behandelten Sphäroiden reduziert und unorganisiert.....	83
Abbildung 41:	Calretinin-positive Zellen in der INL und deren Fortsätze in die IPL	84
Abbildung 42:	Markierung der inneren IPL-Zellen mit Islet-1	85
Abbildung 43 :	Calretinin markierte Zellen sind auch Pax-6 positiv	85
Abbildung 44:	Reduktion der Calretinin-positiven Amakrinzellpopulation durch Glutamatbehandlung.....	86
Abbildung 45:	Calretinin-positive Zellen bilden unter Glutamatbehandlung kaum Fortsätze	87
Abbildung 46:	Charakterisierung der zentralen IPL-Zellen und des äußeren Zellrings mit Islet-1: nach Glutamatbehandlung fehlend	88
Abbildung 47:	Axonin-1 - Expression fehlt in Glutamat behandelten Rosetten-Sphäroiden	90
Abbildung 48:	Stratifizierung der IPL markiert mit CRABP und ChAT an Kulturtage 6 fehlt nach Glutamatbehandlung vollständig	91
Abbildung 49:	Glutaminsynthetase-Antikörperfärbung zum Müllerglianachweis.....	94
Abbildung 50:	Fehlende Müllergliafortsätze und gedrungene Zellkörper in Rosettensphäroiden nach Glutamatbehandlung	94
Abbildung 51:	Verlust der langen Müllerzellfortsätze in Glutaminsäure-behandelten Rosettensphäroiden markiert mit dem Vimentin-antikörper	95
Abbildung 52:	Stäbchen und Zapfen im Rosettensphäroid	97
Abbildung 53:	Stäbchendifferenzierung in der Rosettensphäroidentwicklung	98
Abbildung 54:	Detektion der Rosetten an K2 durch Visinin.....	99
Abbildung 55:	Zunahme des Glutamateffekts mit steigender Konzentration	100
Abbildung 56:	Der Anteil der Stäbchen an der Gesamtsphäroidfläche steigt mit der Kultivierungsdauer in den Glutamat-behandelten Sphäroiden stärker an als in den Kontrollen.....	100
Abbildung 57:	Zunahme der Stäbchen in Glutamatbehandelten Rosettensphäroiden während der Kultivierung an Kulturtage 7, 9 und 13	101

Abbildung 58:	Zunahme der Zapfen in Glutamat-behandelten Rosetten-sphäroiden während der Kultivierung von Kulturtag 4 bis 8	103
Abbildung 59:	Vermehrte Photorezeptorenvorläufer-Signale für Glutamat-behandelte Rosettensphäroide beginnend an Kulturtag 2	104
Abbildung 60:	Mehr Photorezeptorenvorläufer und differenzierte Photorezeptoren in den unorganisierten Bereichen der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide	106
Abbildung 61:	Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12	107
Abbildung 62:	Temporale Expression des roten Opsins der Zapfen und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12	108
Abbildung 63:	„Targeting“ von Photorezeptorfortsätzen in Richtung der zentralen IPL-Zellen im Rosettensphäroid	109
Abbildung 64:	Fehlende Fortsätze der Photorezeptorenvorläufer und differenzierter Photorezeptoren (Zapfen) in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden	110
Abbildung 65:	Projektionen der Photorezeptoren an K8 in die IPL von unbehandelten Rosettensphäroiden und das Fehlen dieser in Glutamat-behandelten Sphäroiden	110
Abbildung 66:	„Whole mounts“ der NMDA - und Glutamat-behandelten Rosettensphäroide gleichen sich	111
Abbildung 67:	NMDA-Wirkung gleicht auch histologisch der Glutamatwirkung bei Rosettensphäroiden	112
Abbildung 68:	„Whole mounts“ der MK 801 behandelten Sphäroide gleichen den Kontrollen	107
Abbildung 69:	Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801 verhindert Wirkung des Glutamats	114

Diskussion

Abbildung 70:	E6-Retina-Rosettensphäroide: Bildung der Horizontalzellschicht	118
Abbildung 71:	Cholinerge Amakrinzellen in der IPL (Typ II) und am Rand der INL	122
Abbildung 72:	„Transiente“ Photorezeptoren (Stäbchen) in Rosettensphäroiden	130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Glutaminsäuremengen und Endkonzentrationen in der 35 mm Schale.	36
Tabelle 2:	Primärantikörper: (innere Retina und Proliferation)	40
Tabelle 3:	Primärantikörper (äußere Retina: Photorezeptoren)	41
Tabelle 4:	Sekundärantikörper	41
Tabelle 5:	Doppelfärbungen	41
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Karnovsky/Roots – Reaktionslösung und Reihenfolge des Ansetzens	43
Tabelle 7:	Annealingtemperatur und Zyklenzahl für spezifische Primer der jeweiligen Gene	47

1. Einleitung

Die Retina ist ein hochspezialisiertes Nervengewebe, das Photonen in elektrische und chemische Signale umwandelt. Diese werden durch ein komplexes neuronales Netzwerk weitergeleitet und in eine codierte Nachricht von Aktionspotentialen übersetzt, um an das Gehirn gesendet werden zu können. Die dreidimensionale Anordnung der verschiedenen Retinazellen bestimmt, wie die Information des visuellen Felds weitergeleitet und vom Beobachter wahrgenommen wird.

Wird diese dreidimensionale Ordnung oder die Zusammensetzung des Retina-Aufbaus gestört, ist es für die Medizin von großer Bedeutung deren Ursachen zu verstehen, um Therapieansätze zu entwickeln oder auch daraus entstehen zu lassen.

1.1 Der Hühnerembryo: Ein Modell für retinale Zelldifferenzierung

Die Hühnerretina als Wirbeltierretina, entsteht wie andere Regionen des zentralen Nervensystems embryologisch aus dem Neuralrohr und ist dadurch Teil des Gehirns. Als leicht zugängliche Struktur bietet die Retina ein hervorragendes Modell für eine detaillierte Analyse neuraler Wirkungszusammenhänge. Ein weiterer wichtiger Vorzug ist, dass die Retina aus einer überschaubaren Anzahl von Nervenzelltypen zusammengesetzt ist. Diese Nervenzellen sind in mehreren klar definierten Zellschichten organisiert - ein großer Vorteil für das Verstehen von strukturellen Abhängigkeiten und den funktionellen Charakteristika der Neuronen. Alle entwicklungs- und neurobiologisch wichtigen Vorgänge wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Schichtenbildung und Apoptose können am Modell der Hühnerretina untersucht werden.

Aufgrund der Möglichkeit die Hühnerembryonen in beliebiger Anzahl extern und zum gewünschten Embryonalstadium zu bebrüten eignet sich Hühnerretina gut für entwicklungsbiologische Untersuchungen.

1.1.1 Entwicklung der Retina

Die Augenanlage stülpt sich aus der Wand des Vorderhirns (Prosencephalon) aus. Der Augenbecher ist über dem Augenbecherstiel mit dem Diencephalon verbunden, das aus dem Prosencephalonbläschen hervorgeht. Aus dem inneren Blatt des Augenbechers entwickelt sich die eigentliche Retina, aus dem äußeren Blatt das Pigmentepithel des Auges. Die Neuroepithelzellen des inneren Blatt des Augenbechers differenzieren sich zu Stäbchen und Zapfen, Bipolaren, Amakrinzellen, Horizontalzellen, Müllerzellen und Ganglienzellen.

Die Photorezeptoren sind nach innen zum Sehventrikel hin gerichtet während die Nervenfasern auf der Oberfläche der Retina zum Augenbecherstiel zusammenlaufen. Das Linsenbläschen schnürt sich vom Ektoderm ab.

In der frühen Retinogenese ist die sich entwickelnde Retina zusammengesetzt aus undifferenzierten, sich teilenden Zellen. Diese Neuroblasten unterziehen sich einer Periode schneller Zellteilungen, was dazu führt, dass sich der Pool der retinalen Progenitorzellen vergrößert. Wie in den meisten Geweben des zentralen Nervensystems zu beobachten, wandern die Zellkerne der retinalen Vorläuferzellen auf und ab über die gesamte Höhe des retinalen Gewebes. Die S-Phase findet dort an der basalen Oberfläche statt, während die Mitose an der apikalen Oberfläche, am Pigmentepithel (RPE) erfolgt. Die Zellkerne wandern zwischen diesen zwei Oberflächen während der G1 und G2 Phase. (interkinetic nuclear movement : INM) (vergl. Abb. 1, A).

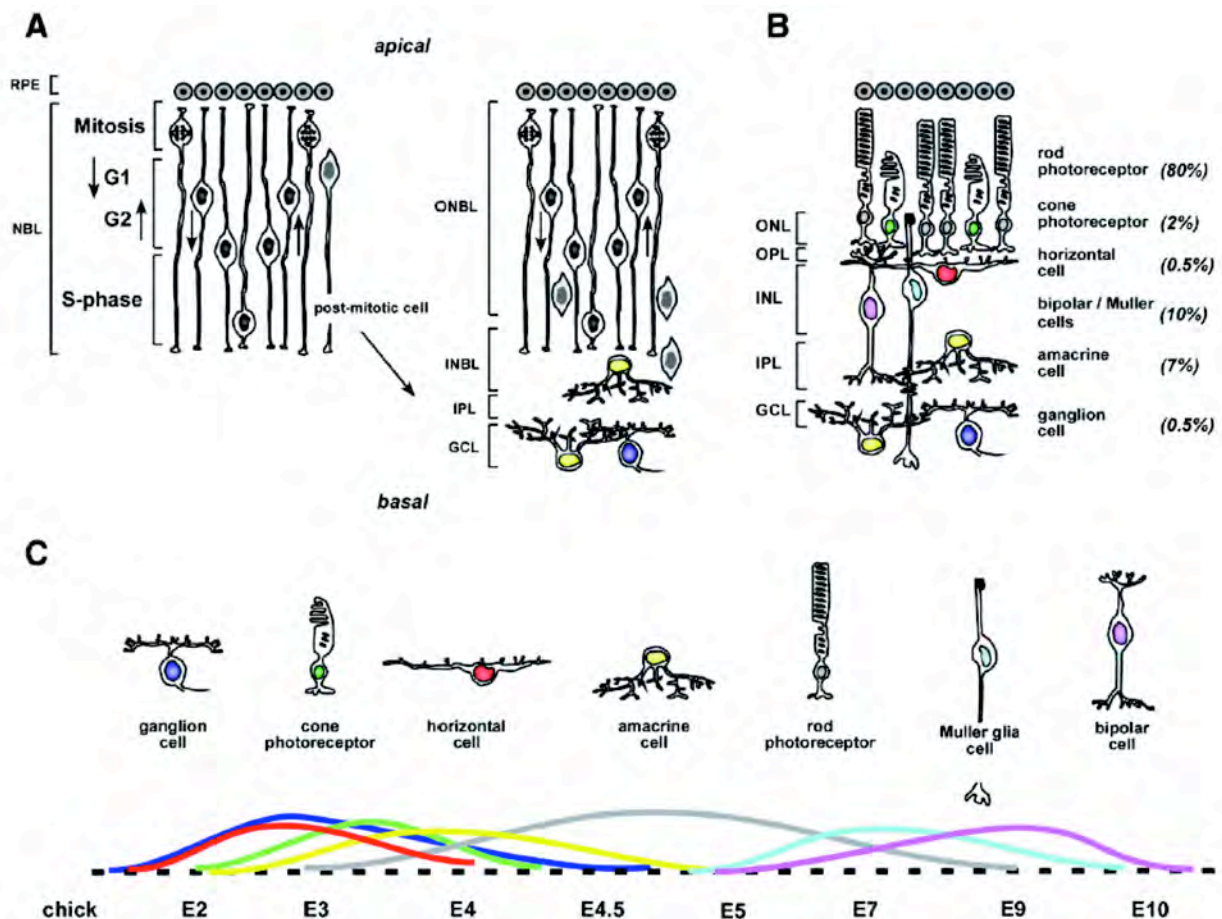


Abbildung 1: Strukturelle Organisation der sich entwickelnden und adulten Wirbeltierretina. A: frühe Retinogenese, B: ausdifferenzierte Retina, C: Die sieben Zelltypen der adulten Retina und ihre 'Geburtstage' in der Retina des Huhns (aus Martins & Pearson 2008).

Die extrazelluläre Umgebung verändert sich deutlich, wenn die Progenitorzellen den Zellzyklus verlassen und differenzieren. Während der Neurogenese setzen differenzierende Zellen eine Vielzahl von Signalmolekülen in die Umgebung frei, welche rückwirkend wiederum auf die sich teilenden Progenitorzellen Einfluss haben. Nach dem Verlassen des Zellzyklus und der Differenzierung sterben zusätzlich verschiedene Zelltypen durch programmierten Zelltod. Es wird angenommen, dass dieser Prozess dazu beiträgt, die jeweils spezifische Anzahl der verschiedenen Retinazellen zu erreichen (Linden et al. 2005). Somit ist in der Retina-Entwicklung eine präzise Koordination von Vorläuferzellen-Proliferation und Zellzyklus-Austritt essentiell für die Bildung einer funktionierenden adulten Retina (Martins & Pearson 2008, Abb. 1). Die Differenzierung beginnt im zentralen Teil der Retina gegenüber der Linse. Anschließend setzt sie sich in beide Richtungen bis in die Peripherie fort. Zuerst differenzieren sich die Ganglienzellen und die Amakrinzellen. Sie verlassen den Zellzyklus ab dem dritten Tag der Embryonalentwicklung des Huhns. Es folgen dann die Photorezeptoren (zuerst die Zapfen, dann die Stäbchen) und Horizontalzellen. Als letztes differenzieren die Bipolarzellen und die Müllergliazellen bis zum Embryonaltag acht in der zentralen Retina (Adler 2000). Die zeitliche Abfolge der Geburt der verschiedenen Retinazelltypen ist evolutionär hoch konserviert. Zwar gibt es kleine chronologische Unterschiede zwischen den Spezies, dennoch werden die Ganglienzellen immer früh geboren, während die Müllerzellen und Bipolarzellen als letztes entstehen. Studien von Zell-Genealogien („cell-lineage“) zeigten, dass retinale Progenitorzellen multipotent sind und alle Neuronen und Gliazellen der Retina bilden können (Turner & Cepko 1987). Es wird angenommen, dass proliferierende, multipotente Progenitorzellen erst einer spezifischen „cell-lineage“ angehören, nachdem sie die letzte Mitose durchlaufen haben (Adler & Hatlee 1989, Belecky-Adams et al. 1996, Cepko 1999).

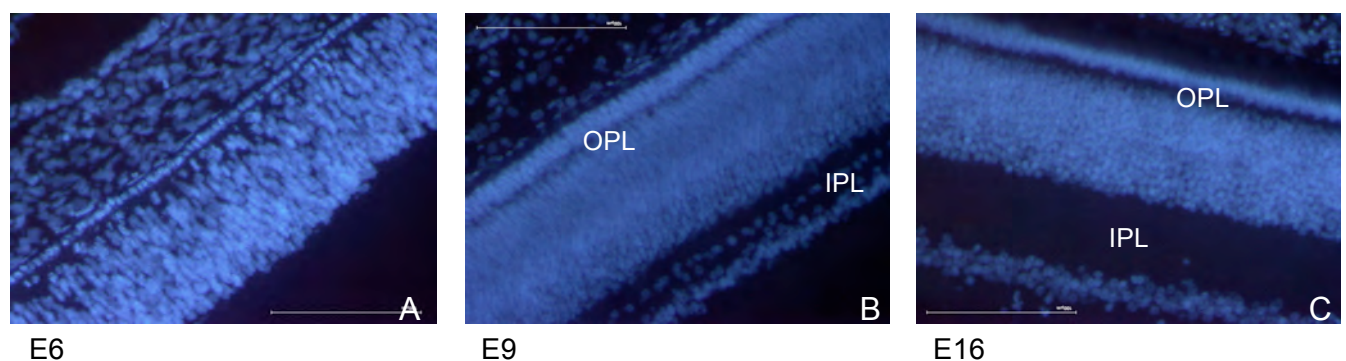


Abbildung 2: Laminierung der Retina. Huhn, Kryostatschnitte, DAPI. Maßstab: 100 µm.

A: ungeschichtetes Neuroepithel E6.

B: OPL und IPL-Bildung E9.

C: ausdifferenzierte Retina mit großem IPL-Bereich und kleinem OPL-Bereich.

IPL-Bildung und OPL-Bildung

Während der Entstehung der spezifischen Anzahl verschiedener retinaler Zellentypen und deren Größenverhältnis zueinander, entsteht die klassische laminare Zellarchitektur der adulten Retina (Abb. 2). Das anfänglich ungeschichtete Neuroepithel wird durch die Bildung der ersten kernfreien Schicht im Inneren der Retina strukturiert. Es entwickelt sich die innere plexiforme Schicht (IPL, inner plexiform layer). Die synaptischen Verbindungen der Wirbeltierretina sind so in eigenen Laminae organisiert (Abb.2). Die Differenzierung der IPL beginnt beim Huhn am Embryonaltag 9 (Drenhaus et al. 2003) und entsteht durch das Auswachsen der Dendriten von Ganglienzellen, Amakrinzellen und Bipolarzellen. Verbindungen zwischen Zellen, die durch eine Zunahme der Lichtstärke (ON) depolarisiert werden, belegen in etwa die innere Hälfte der IPL, während die Verbindungen der Zellen die durch Licht hyperpolarisiert werden (OFF) auf die äußeren Hälfte der IPL begrenzt werden können. Welche Faktoren die Präzision der Synapsen-Verbindungen zwischen den spezifischen Zellen in der IPL kontrollieren sind noch nicht vollständig verstanden (Morgan & Wong 2005). Es ist bekannt, dass die Dendriten der ON und OFF-Ganglienzellen die IPL in verschiedenen Sublaminae stratifizieren, wo sie durch getrennte ON und OFF-Bipolarzellen inputs innerviert werden. Anfangs verästeln sich die unreifen Ganglienzellen über die ganze IPL bevor sie in ON und OFF Sublaminae stratifiziert werden. Dieses Ereignis in der IPL-Entwicklung wird durch die Freisetzung von Glutamat der sich entwickelnden Bipolarzellen reguliert (Chalupa & Günhan 2004).

Ebenso gegliedert in OFF und ON-Sublaminae in der IPL sind die Fortsätze der ‚starburst Amakrinzellen‘. Die meisten dieser Zellen stratifizieren in der Primaten-Retina die innere Hälfte der IPL und haben ihren Zellkörper in der Ganglienzellschicht, einige stratifizieren die äußere Hälfte der IPL und haben ihr Somata in der Amakrinzellschicht. Charakteristischerweise besitzen sie einen einzelnen Dendriten der vom Zellkörper ausgeht und nach einem kurzen Stück sich in bis zu fünf oder mehr radiären Prozesse aufzweigt (Rodieck 1989).

Behandelt man die sich entwickelnde Retina mit dem Glutamat-Analogon APB (2-amino-4-phosphonobutyric acid) verhindert dies die Stratifikation der retinalen Ganglienzellen (Chalupa & Günhan 2004). An der Zebrafischretina wurde das sog. ‚Targeting‘ der Amakrinzellneuriten in die dazugehörige synaptische Schicht in der IPL untersucht. Hier konnte mit Hilfe transgener Zebrafische gezeigt werden, wie Amakrinzellen in der Retinaentwicklung mit hoher Genauigkeit ihre zukünftige Region im synaptischen Neuropil in der inneren Retina, der inneren plexiformen Schicht, ansteuern und innervieren (Godinho et al. 2005).

Die äußere plexiforme Schicht (OPL, outer plexiform layer) bildet sich nach der inneren plexiformen Schicht durch die synaptische Verschaltung der Photorezeptoren mit den Bipolarzellen. Dadurch entsteht auch die innere Körnerschicht (INL, inner nuclear layer). Diese Ent-

wicklung ist am 16. Tag der Embryonalentwicklung des Huhns abgeschlossen und somit ist eine vollständige Laminierung der Retina erreicht (Abb.2 C).

1.1.2 Aufbau der adulten Retina

Die adulte, ausdifferenzierte Retina ist gegliedert in drei zellkernhaltigen und zwei plexiforme, kernlose Schichten (Abb. 3). In der Retina finden sich fünf Grundtypen von Neuronen: Photorezeptoren, Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen. Der einzige Gliazelltyp der Retina ist die Müllerglia. Beginnend mit dem Pigmentepithel (RPE, retinal pigment epithelium) folgen nach innen in der Retina, die äußeren Segmente der Photorezeptoren (OS, outer segments) und deren Zellkörper. Diese bilden die äußere, erste nukleäre Schicht (ONL, outer nuclear layer). Die Fortsätze der Photorezeptoren sind in der äußeren plexiformen Schicht (OPL, outer plexiform layer) mit den Dendriten der Bipolarzellen und Horizontalzellen synaptisch verschaltet. Die Zellkörper der Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und der Müllergliazellen stellen in ihrer Gesamtheit die innere nukleäre Schicht (IPL, inner nuclear layer) dar. In der darauffolgenden inneren plexiformen Schicht (IPL, inner plexiform layer) werden die Dendriten sämtlicher Zelltypen der INL mit den Fortsätzen der Ganglienzellen verschaltet. Durch eine horizontale Verschaltung von den Fortsätzen einiger Zelltypen kommt es in der IPL zur Subbandenbildung (insgesamt fünf). Die Zellkörper der Ganglienzellen bilden die dritte und letzte nukleäre Schicht (GCL, ganglion cell layer). Deren Axone bilden die optische Faserschicht und ziehen zum optischen Tektum. Die Haupttrichtung des Informationsflusses geht von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen über die Bipolarzellen. In der äußeren und inneren plexiformen Schicht, wo die synaptischen Kontakte lokalisiert sind, vermitteln Horizontalzellen und Amakrinzellen laterale Interaktionen. Sie sind verantwortlich für die Modulierung der direkten Transmission. Glutamat und GABA sind die Haupt- exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitter der Retina. (Abb. 3: Glutamaterge Neuronen: rot; GABAerge Neuronen: blau).

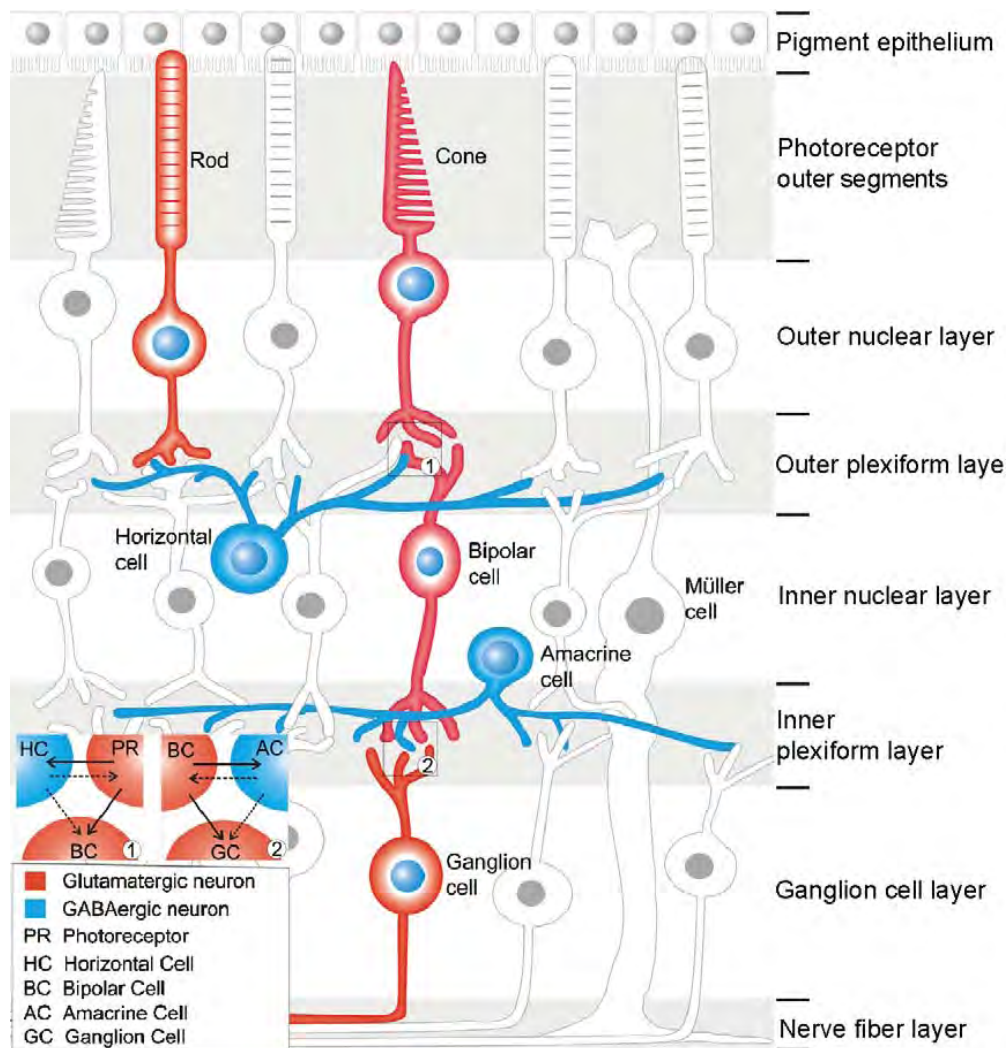


Abbildung 3: Organisation der Wirbeltierretina (aus Yang 2004).

Von oben nach unten: Pigmentepithelium, Photorezeptoren mit äußeren Segmenten, äußere nukleäre Schicht, äußere plexiforme Schicht, innere nukleäre Schicht, innere plexiforme Schicht, Ganglienzellschicht, Nervenfaserschicht.

Rot: Glutamaterge Neuronen, blau: GABAerge Neuronen.

1.1.3 Spezielle Zelltypen der Retina

1.1.3.1 Amakrinzellen

Die Amakrinzellen gehören zu den Interneuronen der Wirbeltierretina. Ihr Name geht auf Ramon y Cajal (1884) zurück und bedeutet: ohne Axon. Für die meisten Amakrinzelltypen gilt dies auch, ein Axon fehlt. Ihre Dendriten sind sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch. Die Zellkörper der Amakrinzellen liegen vorwiegend in der INL, eine wichtige Subpopulation der Amakrinzellen hat ihren Zellkörper jedoch in der Ganglienzellschicht („displaced amacrine“). Von den Retinae bei Wirbeltieren wurden mehr als 30 verschiedene Subtypen von Amakrinzellen beschrieben. Die Fortsätze der Amakrinzellen erstrecken sich in die innere plexiforme Schicht und sind dort synaptisch mit Bipolarzellen, Ganglienzellen und anderen Amakrinzellen verbunden. Dort verzweigen sie sich meist auf einer von zwei Ebenen, und stratifizieren die „on“ und „off“ Banden der IPL. (Licht-ein-/Licht-aus- Reaktion). Die Amakrinzellen sorgen sowohl für eine laterale als auch für eine vertikale Verschaltung des neuronalen Netzwerks in der INL.

Cholinerge Amakrinzellen:

Eine spezielle Unterpopulation sind die cholinergen Amakrinzellen. Sie benutzen Acetylcholin als Neurotransmitter und sind durch das Enzym Acetylcholintransferase (ChAT) charakterisiert, welches Acetylcholin synthetisiert. Cholinerge Amakrinzellen sind wieder in drei Subtypen unterteilt. Typ I befindet sich am proximalen Rand der INL wobei die Zellkerne der Typ II cholinergen Amakrinzellen in die GCL verlagert sind („displaced amacrine“), (Layer et al. 1982), (Abb. 4). Die cholinergen Amakrinzellen des Typ I und II sind in einem fast spiegelbildlichen Muster in horizontaler Ebene in der INL angeordnet (Abb. 4,5), (Spira et al. 1987). Deren Fortsätze sind auf zwei Banden in der IPL begrenzt und gehören zu den frühesten Stratifizierungen in der sich entwickelnden Retina (Wong & Collin 1989). Diese frühe Präsenz dieser cholinergen Schichten weist auf eine organisierende Rolle der cholinergen Amakrinzellpopulation in der embryonalen Retina hin, beispielsweise bei der Positionierung von anderen Stratifizierungen, die eine adulte IPL charakterisieren (Reese et al. 2001). Neuere Studien zeigen auch, dass spontane Wellen von neuraler Aktivität, die die innere Retina in der frühen Entwicklung durchqueren, auf die Signalübermittlung der cholinergen Amakrinzellen zurückzuführen sind (Zhou 1998). Die cholinergen Amakrinzellen regulieren möglicherweise auch intrazelluläre Calciumlevel während der Zellteilung in der entstehenden äußeren Retina, wo sie auch Zellschicksal-Entscheidungen beeinflussen können (Wong et al. 1995). Typ III, der nur bei Vögeln und Reptilien vorkommt, hat seine Zellkerne in der Mitte der INL, ihre Fortsätze sind diffus in Sublamina 1 und 4 der IPL verteilt. Cholinerge Amakrinzellen der embryonalen Hühnerretina und deren dazugehörigen zwei terminalen Banden in der IPL

werden durch Antikörper gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) identifiziert (Abb. 5), (Millar et al. 1985). ChAT-Signale können ab dem Embryonaltag 6,5 in Typ I, ab dem Embryonaltag 8 in Typ I und II nachgewiesen werden, während die ChAT-Expression der cholinergen Amakrinzellen Typ III erst ab Embryonaltag 15 erscheint (Spira et al. 1987). Die phänotypischen Unterschiede während der Entwicklung der Subtypen wird durch das lokale Umfeld („microenvironment“) kontrolliert. Entsprechende Level von muscarinischem „signaling“ zwischen den cholinergen Amakrinzellen, sind für das exakte Mosaikmuster in der INL verantwortlich. (Stanke et al. 2008). Typ I und II der cholinergen Amakrinzellen differenzieren sich aus einer gemeinsamen Population von postmitotischen Zellen im Inneren der IPL. Dies konnte durch ChAT und GABA (gamma-aminobutyric-acid) Antikörperfärbungen nachgewiesen werden (Prada et al. 1999).

Abbildung 4 : *In-vivo* Retina E 10: Typ I und Typ II cholinerg Amakrinzellen. Am proximalen Rand der INL: Typ I und in der IPL: Typ II (Pfeile) (=„displaced amacrine“). Islet-1, DAPI. Maßstab 100 µm.

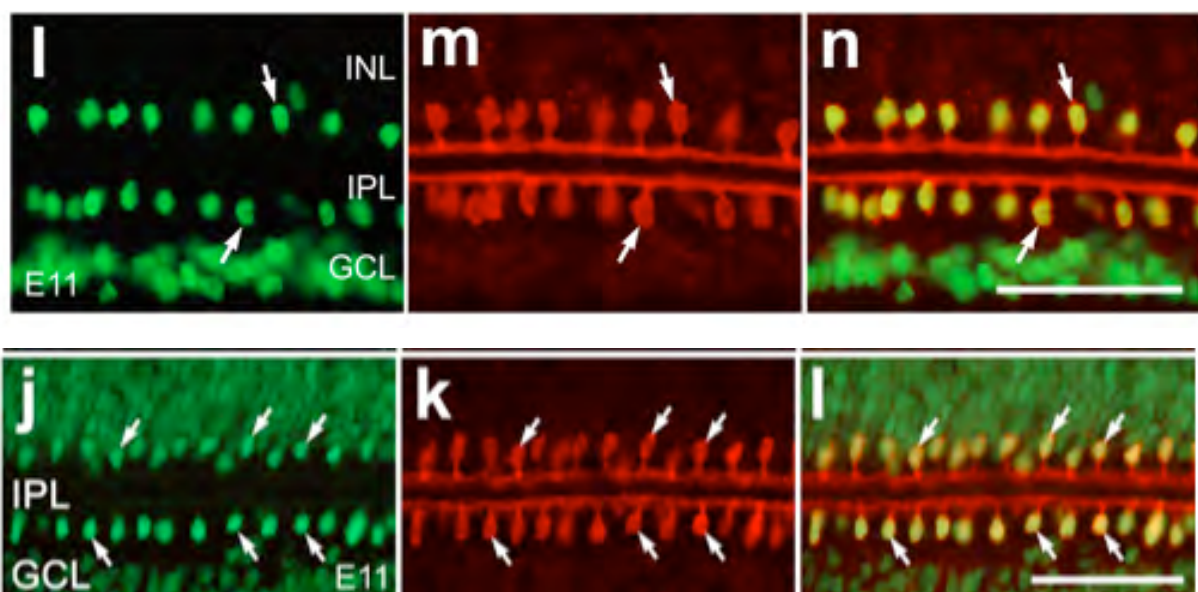
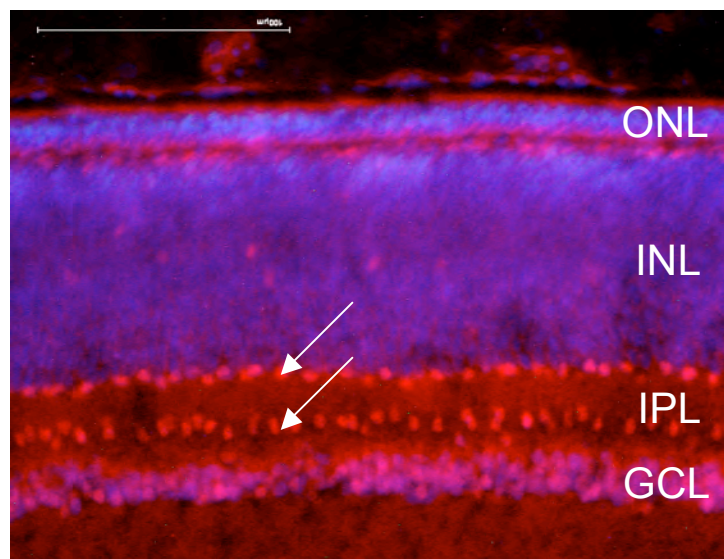


Abbildung 5.: *in-vivo* Retina E 11: Cholinerge Amakrinzellen Typ I und II. Oben: I – n. Expressieren Islet-1 (grün) und ChAT (rot). Unten: j – l. Expressieren Pax-6 (grün) und ChAT (rot). (aus Stanke et al. 2008).

1.1.3.2 Müllergliazellen

Die Müllerzellen sind die Gliazellen der Vogelretina. Sie durchspannen als einziger Zelltyp die gesamte Retina mit ihren Fortsätzen und bilden mit deren Endfüßen sowohl die innere limitierende Membran (ILM, inner limiting membrane), als auch die äußere limitierende Membran (OLM, outer limiting membrane). Ihre Zellkörper liegen in der INL (s. Abb.8).

Einerseits haben sie eine wichtige Stützfunktion in der Retina, indem sie auch die Neuronen mit lateralen Fortsätzen strukturieren. Andererseits sind sie für die physiologische Versorgung der Neurone zuständig. Ihre Hauptaufgabe ist die Aufnahme von Neurotransmittern und ihr Metabolismus (Bringmann et al. 2009).

In der Entwicklung der Retina sind die Müllerzellen von großer Bedeutung. Sie sind für eine korrekte Entstehung der retinatypischen histologischen Organisation mitverantwortlich. Das von ihnen gebildete Netzwerk dient als Skelett für die Neuronen auf dem Weg zu ihrer endgültigen Position (Willbold et al. 1995, 1997). Neuere Forschungen zeigten eine weitere wichtige Eigenschaft der Müllerzellen. Im Falle einer Verletzung der Retina dedifferenzieren die Gliazellen zu multipotenten Progenitorzellen. Aus ihnen können dann sowohl wieder Gliazellen, als auch Neurone entstehen. Somit sind die Müllergliazellen eine Quelle für neurale Regeneration (Fischer et al. 2001).

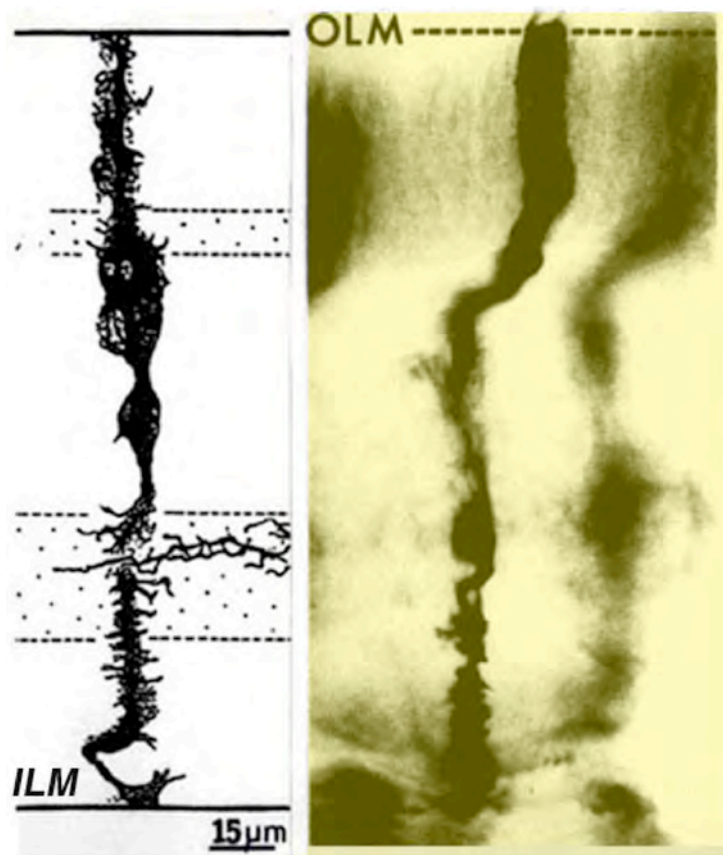


Abbildung 6 : Vertikale Ansicht einer Golgi gefärbten Müllergliazelle.
(www.ncbi.nlm.nih.gov/books/helf/picrender)

1.1.3.3 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren sind die spezialisierten, lichtempfindlichen Neurone der Retina. Sie wandeln das Licht in elektrische und chemische Signale um. Man unterscheidet zwei Typen von Photorezeptoren in der Retina, die Stäbchen, verantwortlich für das Hell-Dunkel-Sehen (skotopisches Sehen) und die Zapfen, verantwortlich für das Farb-Sehen (Photopisches Sehen). Die Stäbchen und Zapfen sind ähnlich aufgebaut (Abb. 7, 8). Das äußere Segment (OS, outer segment) liegt am retinalen Pigmentepithel (RPE). In diesem Außensegment findet die Phototransduktion statt. Über ein Cilium ist es mit dem inneren Segment verbunden, an das sich der Zellkern des Photorezeptors anschließt. Die Zellkerne bilden in ihrer Gesamtheit die äußere Körnerschicht (ONL). Nach einem kurzen Axon folgt die für die Photorezeptoren charakteristische ‚ribbon-synapse‘ und diese endet in der äußeren plexiformen Schicht.

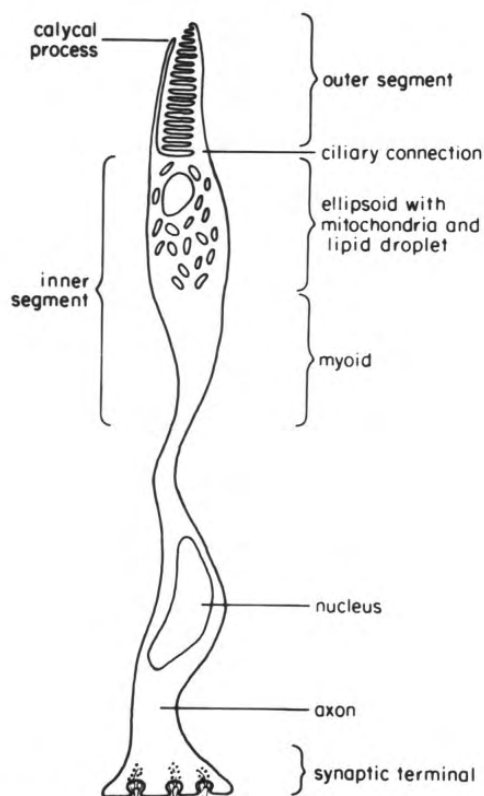


Abbildung 7.: Zapfen, Huhn
(aus Adler 2000)

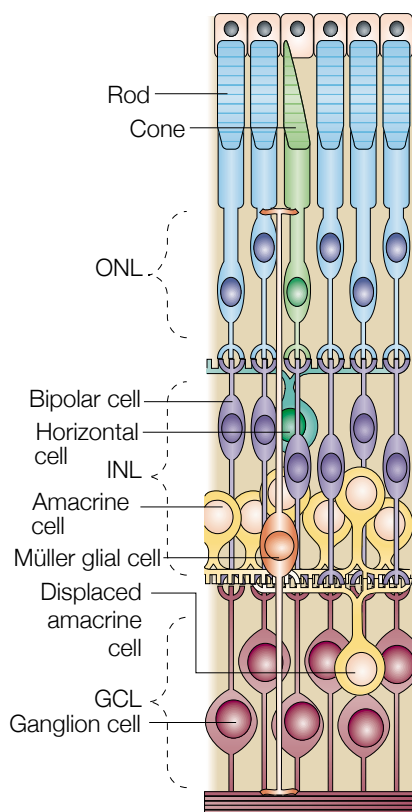


Abbildung 8.: Retinaaufbau
(aus Dyer & Cepko 2001)

Im Gegensatz zu den Stäbchen können die Zapfen beim Huhn in fünf weitere Subtypen unterteilt werden die durch vier Absorptionsmaxima gekennzeichnet sind. Neben den roten, grünen und blauen Zapfen besitzen die Vögel violette Zapfen (Tetrachromaten).

Die Zapfen entwickeln sich in den Wirbeltierretinae kurz vor den Stäbchen (Reichenbach & Robinson 1995). Der Beginn der Gen-Expression der visuellen Pigmente und anderer Photorezeptor spezifischen Gene ist *in-vivo* zwischen Embryonaltag 5 und 8 der Photorezeptor-Entstehung. Eine weitere spezifische Gen-Expression ist zwischen Tag 14 und 16 nachzuweisen, bei der Bildung der äußeren Segmente (Bradford et al. 2005). Die langwelligen Opsine der Zapfen, rot und grün, können in der Hühnerretina erstmals an Embryonaltag 14 in der ‚area centralis‘ nachgewiesen werden, wogegen die kurzwelligen Opsine der Zapfen, blau und violett, erst zwei Tage später in der ‚area centralis‘ und in der temporalen Retina nachgewiesen werden konnten (Bruhn & Cepko 1996).

Zell autonome („cell intrinsic“) Mechanismen sind ein Teil der (frühen) Photorezeptor-Differenzierung, wogegen die Gene der terminalen Differenzierung unabhängig reguliert werden. Dies geschieht durch Signalmoleküle, von denen die meisten noch nicht bekannt sind (Bradford et al. 2005).

1.2 Glutamat

Obwohl eine ausgedehnte elektrische Koppelung zwischen den Neuronen der Retina durch die *gap junctions* existiert, ist die chemische Weiterleitung, vermittelt durch Neurotransmitter, vorherrschend im neuronalen Kreislauf der Retina. In der Retina gibt es eine Vielzahl von Neurotransmittern, dennoch ist Glutamat der wichtigste erregende Neurotransmitter.

Glutamate sind die Salze und Ester der Glutaminsäure. Da im Körper die Glutaminsäure dissoziiert vorliegt wird sie meist Glutamat genannt. Die Glutaminsäure ist eine alpha-Aminoglutarsäure mit der Strukturformel (s. Abb.9) und der Summenformel: $C_5 H_9 NO_4$. Sie kann in Form von zwei Spiegelbildisomeren vorliegen, in der Natur liegt im Wesentlichen nur die L-Glutaminsäure vor.

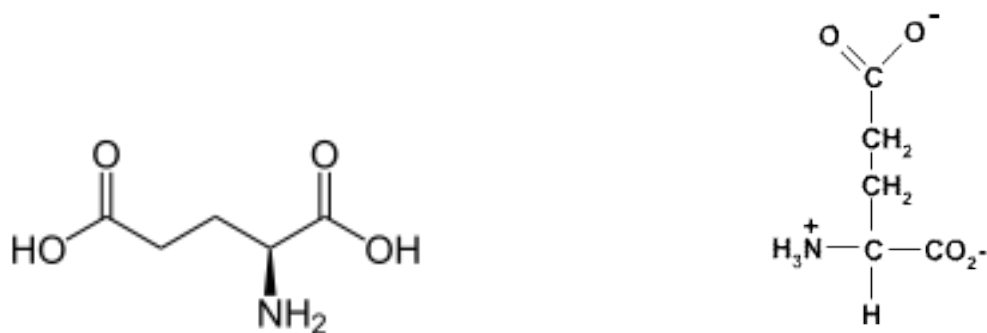


Abbildung 9: L-Glutaminsäure (links) **Strukturformel Glutaminsäure** (rechts)

Glutaminsäure (Glu) ist eine nicht-essentielle Aminosäure, die aus alpha-Ketoglutaratsäure (s. Citratzyklus), Ammoniak und $NADPH_2$ unter dem Einfluss der Glutamatdehydrogenase (GDH) gebildet wird. Ein weiteres Ammoniumion kann über die Reaktion der Glutaminsynthetase abgefangen werden, wobei Glutamin entsteht. Glutaminsäure ist der biochemische Vorläufer der Gamma-Aminobuttersäure (GABA).

Gliazellen nehmen die bei Erregungsübertragung freigesetzte Glutaminsäure über aktiven Transport auf und beenden damit die Erregungsübertragung an der Synapse. Über einen Kreislauf gelangt Glutaminsäure an die Neuronen zurück.

Glutamat ist für den radialen Fluss des visuellen Signals in der Retina verantwortlich. Photorezeptoren und Bipolarzellen setzen Glutamat in den meisten Fällen frei, welches Aktivität im postsynaptischen Neuron erzeugt und / oder abändert. Dies geschieht einerseits, indem direkt die Membranpermeabilität für Ionen verändert wird, oder andererseits durch Aktivierung intrazellulärer Systeme über ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren (Yang

2004). Als erregender Neurotransmitter wirkt er bei den so genannten glutamatergen Neuronen (siehe auch Abb. 3, rot) des Zentralnervensystems auf verschiedene Rezeptoren.

Glutamat und einige strukturell analoge Stoffe sind zusammen als Exzitotoxine bekannt. Dennoch haben sie sowohl erregende als auch zerstörende Wirkung auf zentrale Neuronen, indem sie offensichtlich über die exzitatorischen Rezeptoren auf den dendrosomalen Oberflächen interagieren (Olney 1982). Hohe Glutamatkonzentrationen können auch exzitotoxische Pathologien verursachen (Olney 1982, Choi 1988). Zahlreiche Studien zeigen jedoch, dass Glutamat auch eine wichtige Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt, indem es Migration, Überleben, Differenzierung und Neuritogenese von neuen Neuronen beeinflusst (Rossi & Slater 1993, Rakic & Komuro 1995, Manent et al. 2005). Beim Frettchen konnte gezeigt werden, dass eine frühe Glutamatbehandlung in der Retinaentwicklung die cholinerge Amakrinzellen entfernt was zu einer veränderten Stratifizierung der IPL führt (Reese et al. 2001).

Neuere Untersuchungen zeigten an neuronalen Vorläuferzellen aus dem Nagerhirn, dass Glutamat die Proliferation während der neuronalen Entwicklung moduliert (Luk et al. 2003). Im Weiteren konnte in einer *in-vitro* Studie nachgewiesen werden dass die Zellproliferation von humanen neuronalen Progenitor-Zellen in Kultur erhöht wird. Dieser Effekt wurde über die NMDA-Rezeptoren moduliert. Die Glutamat-behandelten Zellen produzierten signifikant mehr Neuronen, die im Anschluss in die Differenzierungsphase gingen (Suzuki et al. 2006). Auch die Regulation der Zellproliferation von retinalen Vorläuferzellen in der Maus konnte im Experiment aufgezeigt werden (Martins et al. 2006). Die Wirkung des Glutamats bezieht sich auf dessen Konzentration und ist abhängig vom Differenzierungsgrad der Neuronen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Glutamat einerseits schädigende Wirkung auf Zellen und Gewebe im ZNS hat und andererseits fördernden Einfluss auf dessen Zellen in ihrer Entwicklung und Differenzierung ausübt. Diese sowohl negativen als auch positiven Eigenschaften eines chemischen Stoffes, in diesem Fall des Neurotransmitters Glutamat, sind ein oft zu beobachtendes Phänomen in der Biologie. Durch weitere Experimente können noch zusätzliche Eigenschaften des Glutamats gefunden werden und somit auch zum Teil alte Ergebnisse ergänzt und überarbeitet werden.

1.2.1 Glutamat-Rezeptoren

Glutamatrezeptoren sind Transmembranproteine in der Membran von Neuronen, die spezifisch Glutamat binden. Sie kommen überall im Nervensystem vor und zählen zu den exzitatorischen Aminosäurerezeptoren.

Die metabotropen Glutamatrezeptoren zählen zu den phylogenetisch ältesten G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Dies sind Rezeptoren in der Zellmembran, die Signale über GTP-

bindende Proteine ins Zellinnere weiterleiten (Signaltransduktion). Derzeit sind acht metabotrope Glutamat-Rezeptoren bekannt: mGlu₁ bis mGlu₈.

Zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gehören AMPA-Rezeptoren, NMDA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren (Abb. 12). Sie unterscheiden sich im Aufbau, der Sequenz ihrer Untereinheiten, sowie ihren spezifischen Bindungs-, Aktivierungs- und Leitungseigenschaften. Alle drei sind hochaffin für Glutamat und haben unterschiedliche Präferenzen für andere Glutamat-Agonisten, wie die namensgebenden Substanzen Alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionic acid (=AMPA), N-methyl-D-aspartat (=NMDA) und Kainat.

AMPA-Rezeptoren sind tetramere Ionenkanäle, die permeabel für Kalium und Natrium Ionen sind, wogegen Kainat-Rezeptoren pentamere Ionenkanäle sind, die hauptsächlich für Natrium und Kalium leitfähig sind, ein wenig auch für Calcium.

NMDA-Rezeptoren sind tetramere Kationenkanäle. Sie unterscheiden sich in zwei Hauptmerkmalen: Erstens sind sie Liganden-gesteuert und spannungsabhängig und zweitens bedarf es einer Co-Aktivierung durch zwei Liganden - Glutamat und Glycin. Sie sind aus zwei NR1 und zwei NR2 'subunits' zusammengesetzt, von denen die NR1-'subunit' Glycin bindet und die NR2-'subunit' die Glutamat Bindungsstelle aufweist (Laube 1998). Die Öffnung des NMDA-Rezeptorkanals erfordert nicht nur die Bindung von Glutamat, sondern auch die Beseitigung seiner Blockade durch je ein Magnesium-Ion bei der Depolarisation der postsynaptischen Membran. Sein Ionenkanal ist permeabel für K⁺, Na⁺ und Ca²⁺-Ionen. Es wird angenommen, dass der Calcium-Influx durch die NMDA-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität spielt, ein zellulärer Mechanismus für Lernen und Erinnerung. Physiologisch betrachtet ist der NMDA-Rezeptor deshalb wesentlich beteiligt an Lern- und Gedächtnisvorgängen. Pathophysiologisch ist er in viele neurodegenerativen Störungen involviert, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Schizophrenie.

In der Retina besitzen die Amakrinzellen sowohl ionotrope als auch metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR1, mGluR2, mGluR4, mGluR7) und nehmen so das Glutamat aus dem synaptischen Spalt auf. Die Aktivierung der NMDA und nicht-NMDA Glutamatrezeptoren stimuliert die Freisetzung von GABA und Acetylcholin aus den Amakrinzellen. Eine exzessive Aktivierung der Glutamatrezeptoren, beispielsweise während einer Ischämie, führt zum Tod der Amakrinzellen. Ein Calcium-Anstieg bedingt durch den Calcium-Influx der NMDA und AMPA / Kainat-Rezeptorkanäle steht im Zusammenhang mit Zell-Tod in *in-vitro* Studien (Duarte et al. 1998).

Neben der Glutamat – (Agonist) Bindungsstelle und der Bindungsstelle für den Co-Agonisten Glycin sind am NMDA-Rezeptor auch Bindungsstellen für Stoffe vorhanden, die die Aktivität verhindern (Antagonisten). Ein nicht-kompetitiver Antagonist wäre u.a. MK-801 (Dizocilpine) er bindet im Inneren des Ionenkanals und wirkt so als Kanalblocker. MK-801 ist als wir-

kungsvoller Antagonist bekannt und auch als dissoziative Droge in Tierversuch eingehend untersucht (Olney et al. 1991).

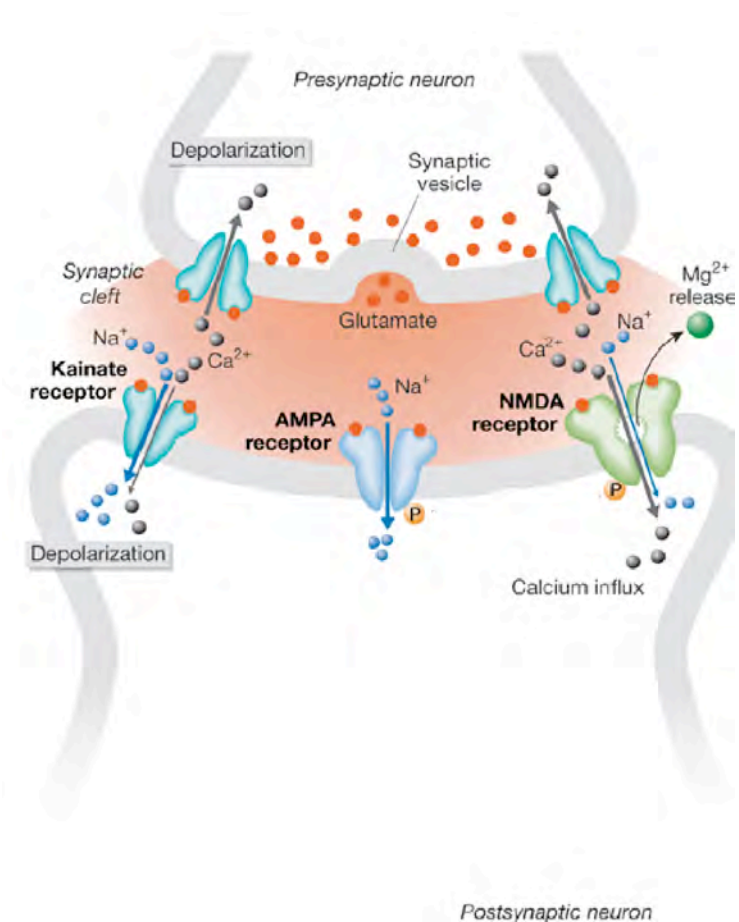


Abbildung 10: Ionotrope Glutamaterezeptoren: Kainat,- AMPA,-und NMDA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. (aus: Voglis & Tavernarakis 2006).

Verteilung der Glutamaterezeptoren in der Retina:

Photorezeptoren besitzen metabotrope Glutamaterezeptoren und die meisten Horizontalzellen exprimieren AMPA-Rezeptoren. Der Signalweg von den Photorezeptoren zu den Bipolarzellen ist sehr komplex. Während AMPA und Kainat Rezeptoren die Transmission für OFF-Typ – Bipolarzellen vermitteln, sind verschiedene Subtypen von Glutamaterezeptoren (sowohl ionotrope als auch metabotrope Glutamaterezeptoren) in die Entstehung der Lichtantwort der ON-Typ Bipolarzellen involviert. Ebenso weisen Amakrinzellen ionotrope Glutamaterezeptoren auf, während die Ganglienzellen ionotrope und metabotrope Glutamaterezeptoren besitzen (Yang 2004; Abb.3: rot markierte Zellen).

1.3 Retinosphäroide als dreidimensionales *in-vitro* Modell

Für wissenschaftliche Fragestellungen sind *in-vivo* Systeme meist nicht ausreichend und schwer zu standardisieren. *In-vitro* kultivierte Zellen dagegen zeichnen sich durch mehrere Vorteile aus. Einerseits können die Zellen über einen definierten Zeitraum unter konstanten Bedingungen beobachtet werden und andererseits kann in diesem *in-vitro* System einfacher manipuliert werden. Mit Kenntnis der Standardkontrollen können Abweichungen leicht erkannt und beschrieben werden.

Ein oft verwendetes *in-vitro* System sind Monolayerkulturen. Dieses zweidimensionale Kultursystem eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung von Gewebestrukturen und deren Entwicklung. Hier sind die dreidimensionalen Aggregate mit dem höheren Organisationsgrad ihrer gewebsähnlichen Strukturen eine entscheidende Weiterentwicklung.

Die dissoziierten Zellen werden in Schüttelkulturen daran gehindert sich abzusetzen und bilden dreidimensionale Aggregate. Diese kugelähnlichen, histotypisch organisierten Aggregate aus retinalen Zellen werden Retinosphäroide genannt. Die Sphäroide sind das Resultat von Zell-Zell-Erkennung, Aggregation, ‚sorting-out‘-Mechanismen und Proliferation.

Die Anfänge der Sphäroidtechnologie gehen auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurück, als Roux (1894) die Aggregation von dissoziierten Einzelzellen bei Amphibien und Seeigelblastomeren beschrieb. Ab der Mitte des 20. Jahrhunderts untersuchte Moscona (1952, 1956, 1962) das Regenerationsverhalten embryonaler Zellen höherer Organismen. Es gelang ihm aus retinalen Einzelzellen dreidimensionale Aggregate herzustellen. Seine Erkenntnisse waren die Grundlage für die Etablierung des heutigen *in-vitro*-Modellsystems, indem die Retinogenese unter kontrollierbaren Bedingungen untersucht werden kann (Vollmer et al. 1984, Layer & Willbold 1989).

Grundsätzlich sind zwei verschiedene Retinosphäroidtypen zu unterscheiden. Zum einen die Stratosphäroide, mit Zellen aus der peripheren Retina und Pigmentepithel, und zum anderen die Rosettensphäroide, mit Zellen aus der zentralen Retina. Im Gegensatz zu den korrekt geschichteten Stratosphäroiden ist die Laminierung der Rosettensphäroide invers im Vergleich mit der *in-vivo* Situation (Vollmer et al. 1984, Layer & Willbold 1994).

Rosettensphäroide

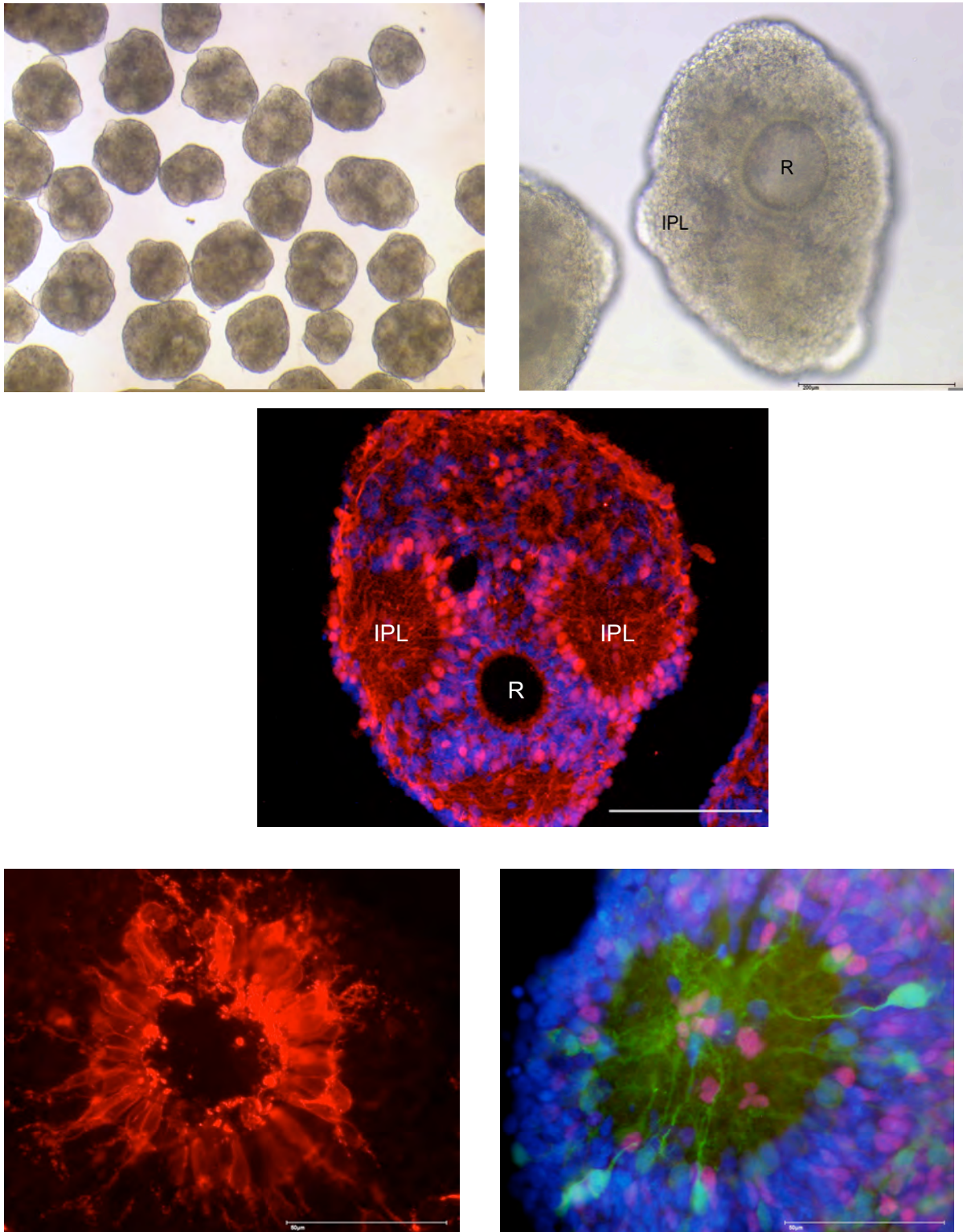


Abbildung 11: Rosettensphäroide Kulturtag 8

Oben: Links: Sphäroide in der Kulturschale. Rechts: Rosettensphäroid mit Rosette (R) und plexiformen Bereich (IPL), (Pfeil). Maßstab 200 µm. Durchlicht. **Mitte:** Kryostatschnitt: DAPI (blau), Pax-6 (rot). Maßstab 200 µm **Unten:** Kryostatschnitte. Links: Rosette mit Stäbchen. Rho4D2, (rot). Rechts: IPL mit inneren Zellen und angrenzender INL. Islet-1 (rot), Calretinin (grün) und DAPI (blau). Maßstab 50 µm.

Rosettensphäroide entstehen aus Zellen der zentralen Retina von 5 bis 6 Tage alten Hühnerembryonen. Während ihrer Kultivierung auf dem Schüttler kommt es zur Bildung von Primär aggregaten („subunits“) die später zu größeren Aggregaten fusionieren (Fujisawa 1973). Nach einer anschließenden Proliferations- und Differenzierungsphase erreichen die Sphäroide nach 12 - 14 Tagen Schüttelkultur ihre endgültige Größe und Struktur (ca. 250 μm).

Alle Rosettensphäroide bestehen aus Rosetten und IPL-Bereichen (Abb. 9), die über unorganisierte Bereiche miteinander verbunden sind. Die Rosetten besitzen im Gegensatz zur *in-vivo* Retina eine inverse Schichtung. Nach einem fortsatzfreien, runden Lumen folgen die Photorezeptoren, die OPL und anschließend eine reduzierte INL. Die IPL- Bereiche sind meist rund, mit wenigen zentralen Zellen in der Mitte. Sie sind mit den Fortsätzen der INL Zellen gefüllt, welche die IPL-Bereiche umgeben (Abb. 9). Während der Entwicklung der Sphäroide, sind die IPL-Bereiche zuerst außen liegend und später zentral im Rosettensphäroid zu finden. Im ausdifferenzierten Sphäroid entwickelt sich noch zusätzlich ein weiterer runder, randständiger, flacher IPL-Bereich (Abb. 10). Die unorganisierten Bereiche besitzen keine erkennbare Schichtung. Die Zellen darin sind nicht so dicht gepackt wie in den INL-Bereichen. Ein großer Anteil dieser Zellen sind Photorezeptoren.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass die Entwicklung *in-vitro* nicht automatisch die *in-vivo* Entwicklung widerspiegelt. Die Zellen befinden sich in Kultur und nicht in ihrer natürlichen Umgebung.

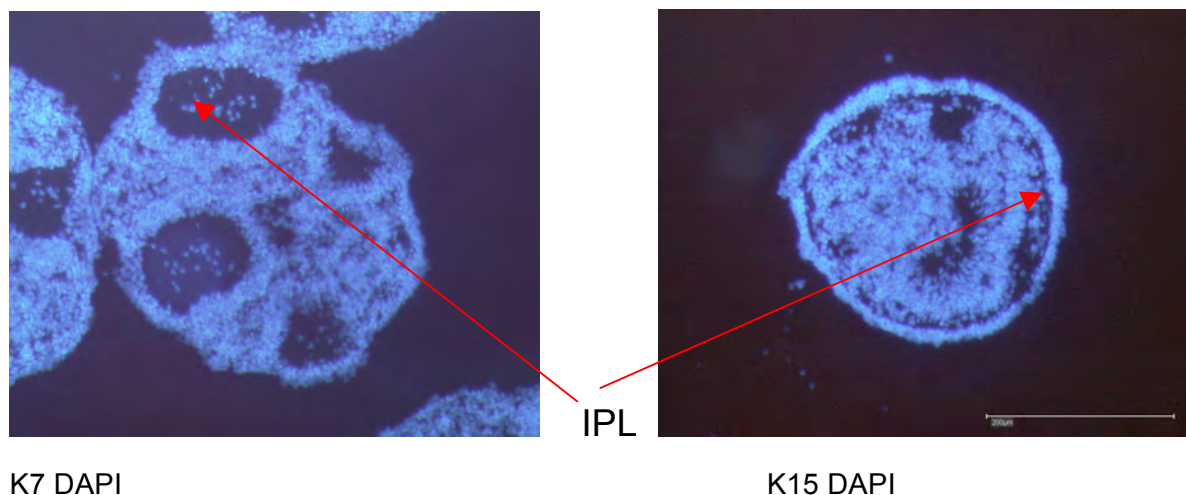


Abbildung 12: IPL-Bereiche im Rosettensphäroid. DAPI. Maßstab: 200 μm .

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe des dreidimensionalen *in-vitro* Sphäroid Systems die Bedeutung der cholinergen Amakrinzellen bei der Bildung der inneren plexiformen Schicht und deren Stratifizierung für die Entwicklung der Retina zu untersuchen und zu beschreiben. Dies erfolgt durch Behandlung der Rosettensphäroide mit dem Neurotransmitter Glutamat. Ausgangspunkt waren neuere Studien an der *in-vivo* Retina des Frettschens, in denen die cholinerge Amakrinzellpopulation der INL durch Glutamat vollständig entfernt wurde. Dadurch wurde die cholinerge Stratifizierung der IPL nachhaltig gestört. Dieser Einfluss des Glutamats auf diese spezifische Zellpopulation der inneren nukleären Schicht soll unter standardisierten Bedingungen an Rosettensphäroiden aus der Hühnerretina untersucht werden. Des Weiteren sollen zusätzliche Auswirkungen des Glutamats auf die anderen Zelltypen der Retina beschrieben werden.

Der Neurotransmitter Glutamat ist neben dieser Wirkung auf die cholinergen Neuronen der Retina auch an Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen beteiligt. So sollen zusätzlich Abweichungen von der normalen Entwicklung aufgezeigt werden. Glutamat ist in höheren Konzentrationen allgemein bekannt als Neurotoxin. Dadurch sind Glutamatbehandlungen meist durch negative Auswirkungen auf Gewebe und deren Zellen charakterisiert. Dennoch gibt es mit geringen Glutamatkonzentrationen durchaus positive oder fördernde Einflüsse auf einzelne Zelltypen und Gewebsverbände. Diese nicht toxischen Auswirkungen, sowie weitere Funktionen von Glutamat, neben den bekannten Neurotransmitter Eigenschaften, sollen anhand der Entwicklung der Rosettensphäroide beschrieben werden.

Beginnend wurde im ersten Teil der Arbeit geklärt ob die Entwicklung und Differenzierung der Rosettensphäroide vom Alter der präparierten Retina abhängt. Anhand von 5 oder 6 Tagen (Hamburger/Hamilton Stadium 25/26 oder 29) alten Hühnerembryonen wurden aus dessen Retinae Rosettensphäroide hergestellt und in Bezug auf ihre Entwicklung, Differenzierung und Morphologie verglichen. Dazu war ein hoher Präparationsstandard notwendig, um die üblichen Schwankungen zwischen den verschiedenen Präparationen von den erzielten Resultaten zu unterscheiden.

Anschließend wurden im zweiten Teil der Arbeit anhand von Antikörperfärbungen, detaillierter Histologie und mit Hilfe molekularbiologischen Methoden die Auswirkungen des Glutamats primär auf die cholinerge Amakrinzellpopulation der Rosettensphäroide untersucht. Damit zusammenhängend sollte die AChE-Aktivität dieser Zellen im Rosettensphäroid nach der Glutamatbehandlung abweichend vom der normalen Sphäroidentwicklung beschrieben werden. Des weiteren wird der Einfluss des Glutamats auf die restlichen Zelltypen der Retina

untersucht, und deren Rolle im dreidimensionalen Gewebeverband des Rosettensphäroidsystems dargestellt. Abschließend werden die gewonnenen Ergebnisse für die Bedeutung der IPL-Bildung in der Retinaentwicklung aufgezeigt.

Eine korrekte IPL-Entwicklung ist für das Funktionieren einer gesunden Retina notwendig. Zusammen ist all dies entscheidend für das Verstehen von Fehlentwicklungen der Retina und für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten retinaler Erkrankungen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

ATC	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
BrdU	Boehringer, Mannheim
DAPI	Merck, Darmstadt
DEPC	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
(L)Glutamaminsäure	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
GYKI 52466	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kainsäure	Sigma, Deisenhofen
KCl	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MK 801 (Dizocilpine)	Sigma, Deisenhofen
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
Na-Citrat	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
10x Polymerase-Puffer	Promega, Mannheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tri-Reagent	Sigma, Deisenhofen
Iso-ompa	Sigma, Deisenhofen

3.1.2 Aggregationsmedium und Zusätze

DMEM	Gibco, Eggenstein / C.C.pro X
Chicken Serum (CS)	Gibco, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	perbio

Gentamycin	Lonza
Penicillin/Streptomycin	Lonza
L-Glutamin	Lonza
F12-Medium	Gibco, Eggenstein/ C.C.pro X
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma

3.1.3 Puffer und Medienzusammensetzung

Aggregationsmedium

DMEM
 10% FCS
 2% CS (Chicken Serum)
 1% L-Glutamin
 0,1% Penicillin/Streptomycin
 0,02 mg/ml Gentamycin

10x PBS

80g NaCl (1,37 M)
 2g KCl (27 mM)
 11,5g Na₂HPO₄ (83 mM)
 2g KH₂PO₄ (15 mM)
 ad 1l H₂O dest., pH 6,8

1x PBS

50 ml 10x PBS
 450 ml H₂O dest.

PBSTx

50 ml 1x PBS
 50 µl Triton X-100

Blocklösung

1% BSA
 0,1% Triton X-100
 ad 20 ml 1x PBS

25% Saccharose Lösung

25g Saccharose

100 ml 1x PBS

4% Paraformaldehyd

4g PFA

in 80 ml 1x PBS und mit 10 M NaOH

auf pH 11 bringen, dann lösen

mit 37% HCl auf pH 7,3 einstellen

ad 100 ml 1x PBS

Homogenisationspuffer1 mM NaHCO₃0,2 mM MgCl₂ x 6 H₂O0,2 mM CaCl₂ x H₂O

1 mM Spermidin

Ellman-Puffer1 MK₂HPO₄KH₂PO₄

0,1 MKPi-Puffer pH 8,0

NaHCO₃ zum Lösen der Ellman-Reagenz DTNBBradford-Reagenz

0,01% Coomassie Brilliant Blue G 250

4,7% Ethanol

8,5% Phosphorsäure

3.1.4 Antikörper

Primärantikörper

AChE 3D10, Karl Tsim

Axonin-1 DSHB

BrdU G3B4, DSHB

Calretinin Swant, Bellinzona

Cern 901 Willem DeGrig, Niederlande

Cern 906	Willem DeGrip, Niederlande
ChAT	Miles Epstein, Wisconsin
CRABP	Jack Saari, Washington
GABA	Sigma, Deisenhofen
Glutamin-Synthetase	BD Biosciences, Heidelberg
Islet-1	40.3A4; DSHB
PAX-6	Pax6; DSHB
Rho 4D2	David Hicks, Straßbourg
Transitin	EAP3; DSHB
Vimentin	H5; DSHB
Visinin	7G4; DSHB

Sekundärantikörper

Cy2 donkey-anti-mouse	Dianova, Hamburg
Cy2 rabbit-anti-mouse	Dianova, Hamburg
Cy2 goat-anti-rabbit	Dianova, Hamburg
Cy3 rabbit-anti-mouse	Dianova, Hamburg
Cy3 donkey-anti-mouse	Dianova, Hamburg

3.1.5 Primer

GAPDH	<i>sense:</i> CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG <i>antisense:</i> TGGCTGTCACCATTGAAGTC
ChAT	<i>sense:</i> TTGCTGACGACTGATGGAAG <i>antisense:</i> CATGTGCTTGAGCAGGTGTT
Rhodopsin	<i>sense:</i> ACTCCGGACGCCTCTAAACT <i>antisense:</i> TCCTTCACAGTGCAGACCAG
Red Opsin	<i>sense:</i> CAGAAGCAGTAGGCCACGAT <i>antisense:</i> ATCAACCAGATCTCGGGGTA
AChE	<i>sense:</i> GGTCGAGGGTTCCTATTTCC <i>antisense:</i> ATCCACGAAGGCCACAATAG

3.1.6 Reaktionsansätze

In-situ-Zelltod-Detektion (TUNEL)

In situ cell death detection kit,

Boehringer, Mannheim

Reverse Transkription

Reverse Transcription System

Promega, Mannheim

3.1.7 Enzyme

Desoxyribonuklease

Worthington Biochemical Corp., USA

Ribonuklease

Promega, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase

New England Biolabs

Trypsin

Worthington Biochemical Corp., USA

3.1.8 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Deckgläser

Merck, Darmstadt

DNA-Molekulargewichtsmarker

Roth, Karlsruhe

DNA-Ladepuffer

Roth, Karlsruhe

Eppendorf-Reaktionsgefäße: 0,1, 0,5, 1,5, 2 ml

Eppendorf, Hamburg

Fettstift (PAP-PEN)

SCI, München

Kaiser's Glyceringelatine

Merck, Darmstadt

Mowiol

Sigma Deisenhofen

Objektträger 76x26mm

Roth, Karlsruhe

Objektträger 76 x 26mm (Superfrost)

Merck, Darmstadt

Parafilm

Neolab, Heidelberg

Petrischalen (35mm, beschichtet)

Greiner, Frickenhausen

Tissue Tec

Miles Scientific, USA

Zentrifugenröhrchen (15ml)

Greiner, Frickenhausen

3.1.9 Versuchstiere

Die Eier der Haushuhnrasse *white leghorn* (*Gallus gallus domesticus*) dienen als Versuchstiere. Die befruchteten Eier werden über LSL Rhein-Main (Geflügelvermehrungsbetrieb) in Dieburg bezogen.

3.1.10 Geräte

Analysenwaage

Sartorius, Göttingen

Axiophot mit Auflicht-Fluoreszenz

Carl Zeiss, Jena

(Zeiss Observer Hal100)

Carl Zeiss Jena

Binokular Stemi SV11

Carl Zeiss, Jena

CO ₂ - Inkubator	Heraeus, Hanau
Kryostat HM 500 OM	Microm, Walldorf
HM 500 OM, Vacutome	Microm, Walldorf
HM 550	Microm, Walldorf
Magnetrührer	Itec, Staufen
pH-Meter MP 220	Mettler, Toledo
Schütteltisch	GFL, Burgwald
Schüttler für Rotationskulturen	Eigenbau MPI Entwicklungsbiologie Tübingen
Spektralphotometer	Biomate Thermo
Sterilbank HLB 2448	Heraeus, Hanau
Thermocycler MWG	Ebersberg
Vortexgeräte	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße	Hermle, Wehingen

3.1.11 Software

Diskus Histologie MAN F70B Version 4.30.652-#377	Büro Hilgers, Königswinter
Image J 1.38x	National Institute of Health, U.S.A.
Multianalyst 2.0	Biorad, München
Photoshop	Adobe
MS Office	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Rosettensphäroiden

Inkubation der Eier

Die befruchteten Eier (*white leghorn*) werden bis zum Einlegen in den Brutschrank bei 14 Grad Celsius gelagert. Das Bebrüten der Eier im Inkubator erfolgt bei 37°C, 4% CO₂ und 85% Luftfeuchtigkeit. Dort werden die Eier in einem dreistündigen Intervall gedreht. Nach der gewünschten Bebrütungsdauer werden die Eier für die Präparation entnommen.

Präparation der Embryonen

Die sechs Tage alten Hühnerembryonen werden aus dem Ei entnommen und nach Hamburger / Hamilton (Stadium 29) bestimmt. Die Embryonen werden dekapitiert und die Augen mit einer Rundpinzette herauspräpariert. Die isolierten Augen werden im F12-Medium auf Eis gesammelt. Anschließend werden die Augen in eine zentrale und eine periphere Hälfte etwa parallel zur *Ora serrata* zerteilt und der Glaskörper entnommen. Im Ca-freien Medium (CMF-freies Hanks Medium) wird die zentrale Retina vom zentralen Pigmentepithel abgelöst. Das Retinagewebe wird auf Eis in F12- Medium in einem 15 ml Tube gesammelt.

Einzelzellpräparation (Zelldissoziation)

Vom Retinagewebe wird nach dem Zentrifugieren (5 Minuten bei 900 rpm) der Überstand abgezogen und dieses mit 100 µl Trypsin (von 1 mg/ml in F12) und 1900 µl vorgewärmten (RT) F12-Medium versetzt. Das Gewebe wird durch Klopfen aufgeschüttelt und bei 37°C (RT) für 6 - 8 Minuten verdaut (enzymatische Zellvereinzelung).

Der Trypsinverdau wird durch 5ml kaltes Aggregationsmedium gestoppt. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) in 8 ml F 12-Medium findet die mechanische Zellvereinzelung statt. Dies geschieht mit Hilfe einer rundgeschmolzenen, verengten Pasteurpipette in 200 µl DNAse (Stammlösung: 50 ng/ml 0,15M NaCl) und 1800 µl Ca-freier Hanks (HBSS). Das Retinagewebe wird mit dieser Pinzette ca. 25 - 30 mal auf und abgezogen (zerspritzt). Anschließend wird der Grad der Vereinzelung mikroskopisch kontrolliert. Um die, durch die mechanische Vereinzelung freigesetzte DNA zu verdauen, wird bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion der DNase wird durch Zugabe von 5 ml F12 Medium beendet. Anschließend wird die Zellsuspension 8 Minuten bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand muss sich durch eine klare Grenze vom Pellet abgrenzen und kann dann abgezogen werden. Weitere drei Waschschrte in F12-Medium stehen vor der Aufnahme des Pellets in Aggregationsmedium.

Das Zellsediment wird in einem spezifischen Volumen Aggregationsmedium aufgenommen und resuspendiert (Pro 35 mm Schale 2 Augen; entspricht ca. 2×10^6 Zellen in 100 μ l. Anzahl der Schalen mal 100 μ l Aggregationsmedium). Dann werden davon je 100 μ l Zellsuspension zu vorgelegten 1900 μ l Aggregationsmedium pro Kulturschale dazugegeben. Die Kultivierung erfolgt auf einem Rotationsschüttler im Inkubator bei 75 U/min, 4% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C. Ein Mediumwechsel findet jeden zweiten Tag statt.

Insgesamt ist bei der Präparation darauf zu achten, dass alle zu präparierenden Augen dieselbe Größe haben, d.h. die Embryonen das gleiche Stadium nach Hamburger/Hamilton aufweisen. Verletzte Glaskörper, wie auch eine zu starke chemische oder mechanische Vereinzelung führen später zu Verklumpungen in den Kulturen. Deshalb ist eine mikroskopische Kontrolle nach der mechanischen Vereinzelung unbedingt erforderlich. Eine Unterschreitung oder eine Überschreitung der spezifischen Rotations-Geschwindigkeit für Rosettensphäroide aus der Hühnerretina kann auch zum Verklumpen der Sphäroide oder deutlichen Abweichungen vom Standard führen. Voraussetzung für eine lange Kultivierung der Sphäroide ist in jedem Fall ein steriles, zügiges Arbeiten.

3.2.2 Kultivierung und Behandlung von Rosettensphäroiden mit Glutamat

Beginnend mit dem Tag der Präparation bleiben die sich differenzierenden Sphäroide durchschnittlich 15 Tage auf dem Schüttler. Beim Mediumwechsel jeden zweiten Tag wird das verbrauchte Medium abgezogen und 2 ml frisches Aggregationsmedium dazugegeben. Pro 35 mm Kulturschale wird am Präparationstag die Retinazellmenge entsprechend 2 Augen (s.3.2.1) in die vorgelegten 1900 μ l Aggregationsmedium ausgesät. Die Schälchen werden dann horizontal im Inkubator mit 75 Umdrehungen pro Minute geschwenkt. Für die Behandlung der Sphäroide mit Glutaminsäure werden die verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 1) zum vorgelegten Medium gegeben. Bei jedem Medienwechsel wird die entsprechende Glutaminsäuremenge erneut zugegeben. Die Kontrollschälchen enthalten ausschließlich Aggregationsmedium.

	Endkonzentration in 2ml DMEM
100 μ l 2 mM L- Glutaminsäure in 1900 μ l DMEM	0,1 mM
200 μ l 2 mM L- Glutaminsäure in 1800 μ l DMEM	0,2 mM
400 μ l 2 mM L- Glutaminsäure in 1600 μ l DMEM	0,4 mM

Tabelle 1: Glutaminsäuremengen und Endkonzentrationen in der 35 mm Schale.

3.2.2.1 Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801

Zu einer 0,4 mM Glutamat-Endkonzentration wurden eine 100 nM Endkonzentration des spezifischen NMDA-Blockers MK 801 gewählt.

3.2.3 Fixierung und Herstellung von Gefrierschnitten

Die Rosettensphäroide werden am gewünschten Kulturtag in ein Eppendorfgefäß überführt und das Medium abgezogen. Danach werden die Sphäroide zweimal in 1x PBS 10 Minuten gewaschen und in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur 30 Minuten fixiert. Anschließend folgen zwei weitere Waschschrte in PBS. Nach Abziehen der Waschlösung werden die Rosettensphäroide in einer 25% Saccharoselösung bis zum Schneiden am Kryostat bei 4°C gelagert. Sobald die Sphäroide in der Saccharose abgesunken sind, können sie am Kryostat geschnitten werden. Ähnlich werden die ganzen Augen für die *in-vivo* Schnitte behandelt. Abhängig von der Größe oder dem Bebrütungstag verlängert sich die Fixationsdauer von 2 Stunden bei RT bis zu einer über Nacht Fixierung bei 4°C.

Einen Tag nach dem Absinken der Sphäroide hat die Saccharose vollständig das Gewebe durchdrungen und es können am Kryostat gute histologische Schnitte angefertigt werden. Auf dem Objektisch wird nach einer Grundschrift ‚tissue tec‘ ein Tropfen Saccharose vorgelegt, dann die Sphäroide in nur einem weiteren Tropfen mittels Pasteurpipette blasenfrei aufgebracht. Dies geschieht bei einer Box- und Objektischtemperatur von -29°C bis -30°C. Nach weiterer Ummantelung der Sphäroide mit Saccharose muss der Block gleichmäßig durchfrieren und kann dann getrimmt werden. Es werden anschließend 10 -14 µm dicke Schnitte bei einer Box - und Objektisch-temperatur von -28°C bis -30°C hergestellt (Temperatur abhängig vom Kryostatyp).

Für die fixierten embryonalen Augen verlängert sich die Inkubationszeit in der Saccharose um einen Tag. Größere Augen müssen vor dem Auffrieren mit Hilfe einer Injektionsspritze mit Saccharose gefüllt werden, bis sie wieder prall sind. Dann wird das Auge in der gewünschten Orientierung auf dem Objektisch aufgefroren und langsam mit Saccharose ummantelt. Nach vollständigem Durchfrieren werden möglichst dünne (9 bis 12 µm) Schnitte um die Linsenregion angefertigt. Alle Schnitte werden auf gelatinierten Objektträgern aufgenommen, über Nacht getrocknet bei RT und dann bei -20°C (bzw. -80°C für längere Aufbewahrung) gelagert.

3.2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird auch als Immunhistologie oder Antikörperfärbung bezeichnet. Mit dieser Methode werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern detektiert und lokalisiert. Der Nachweis beruht auf der Erkennung von Antigenen durch einen spezifischen Antikörper (Antigen-Antikörper-Reaktion).

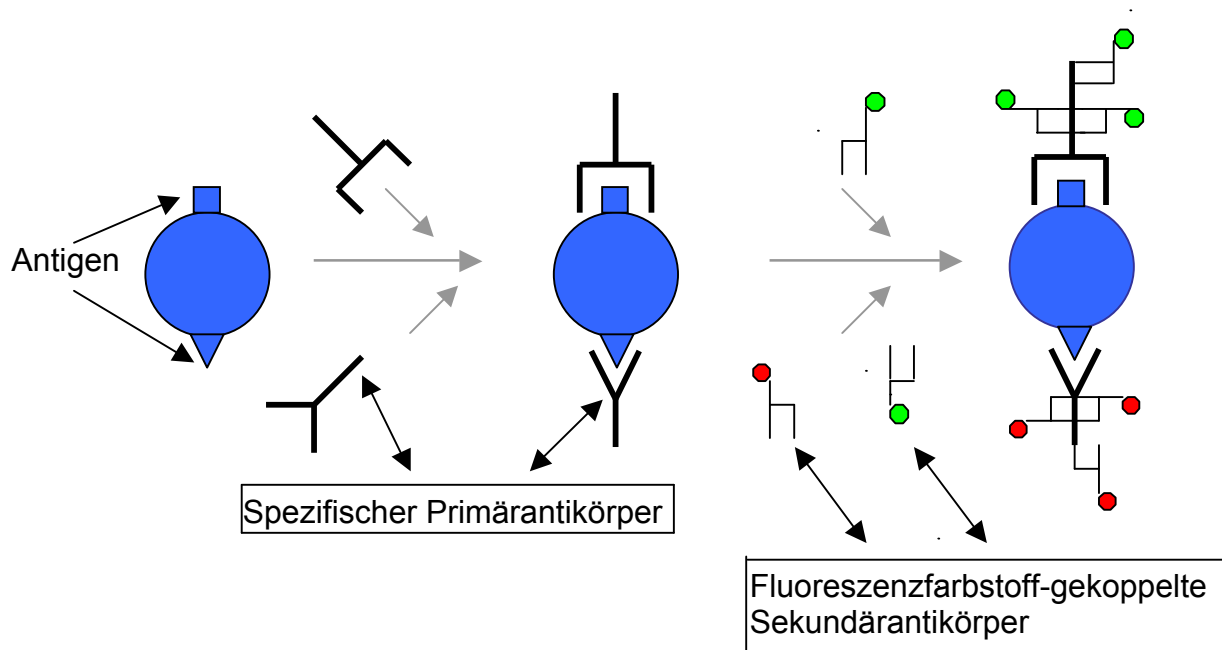


Abbildung 13 : Schematische Darstellung einer Antikörperfärbung. Der spezifische Primärantikörper bindet an das Antigen der Zielzelle. Die Sekundärantikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und binden an den Primärantikörper.

Der mikroskopische Nachweis erfolgt zum Teil mit der direkten Methode, d.h. der spezifische Antikörper ist mit einem Fluorochrom gekoppelt und das gesuchte Protein kann direkt sichtbar gemacht werden.

Bei der hier verwendeten indirekten Methode werden in einem ersten Schritt ein spezifischer Primärantikörper verwendet, der am gesuchten Protein (Antigen) bindet. Durch einen Sekundärantikörper, welcher am Primärantikörper bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist erfolgt der mikroskopische Nachweis. Da mehrere Sekundärantikörper an einem Primärantikörper binden können, führt dies zur Verstärkung des Signals (Abb.13).

Einfach - und Doppelfärbungen

In der Immunhistochemie werden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Die monoklonalen Antikörper werden nur von einem einzigen B-Lymphozyten-Zellklon gebildet und richten sich gegen ein einzelnes Epitop. Polyklonale Antikörper dagegen werden von verschiedenen Zelllinien gebildet und enthalten dadurch eine Mischung von Antikörpern. Sie richten sich alle gegen dasselbe Protein, besetzen aber unterschiedliche Epitope dieses Proteins.

Für alle Färbungen wird mit dem Auftauen und Trocknen der Kryoschnitte auf einer 37°C warmen Heizplatte begonnen. Die Schnitte werden auf den Objektträgern mit einem Fettstift („PapPen“) umrandet, um das Abfließen von Flüssigkeit zu vermeiden.

Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, werden die Schnitte mit einer 1%-igen Rinderserumalbumin-Lösung (1% BSA, 0,1% Triton in PBS) für 10 Minuten geblockt. Dies soll eine mögliche Hintergrundfärbung verhindern oder minimieren. Im Weiteren sind sowohl der Primär - als auch der Sekundärantikörper in dieser 1 % Blocklösung verdünnt.

Nach dem Abkippen der Blocklösung folgt die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper. Es werden 100 µl Primärantikörper gleichmäßig aufgetropft. Die entsprechende Inkubationsdauer und Verdünnung kann der Tabelle (2 und 3) „Primär-antikörper“ entnommen werden.

Auf zwei 10-minütige Waschschrte mit 1x PBS folgt die einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers (100 µl pro Objektträger). Die verwendeten Sekundärantikörper richten sich nach dem eingesetzten Primärantikörper (siehe Tabelle 4, Sekundär-antikörper). Um eine Abschwächung der Signalstärke zu verhindern, erfolgt ab jetzt die Inkubation der Objektträger im Dunkeln. Weitere zwei Waschschrte mit 1x PBS (je 10 min) folgen.

Für die Darstellung der Zellkerne schließt sich eine DAPI-Färbung an. Dafür werden die Schnitte auf den Objektträgern für 1 Minute mit einer DAPI- Lösung (0,1 µg/ml in PBS) überschichtet. Nach Abkippen dieser Lösung wird noch einmal mit 1x PBS gewaschen. Im letzten Schritt werden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser getaucht, um eine Salzbildung beim Trocknen zu vermeiden.

Danach werden sie auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet und mit Mowiol oder Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Wichtig ist, dass bei allen Färbungen eine Negativ-Färbekontrolle mitgeführt wird, bei der kein Primärantikörper aufgegeben wird.

Im Gegensatz zu den Einfachfärbungen werden bei den Doppelfärbungen (Tabelle 5) gleichzeitig ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper Primärantikörper aufgegeben. Sie werden in ihrer spezifischen Verdünnung gleichzeitig auf den Schnitt gegeben. Meistens ist

dieselbe Inkubationszeit - wie bei der Einzelfärbung - ausreichend, in Einzelfällen kann auch über Nacht bei 4°C inkubiert werden.

Primär-antikörper	Spezifität	Herkunft	Verdünnung	Inkubations-dauer	Sekundär-antikörper
3D10 AChE	monoklonal gegen AChE	Maus	1:100 unverdünnt	75 min RT	Cy3 d α m
ChAT	Polyklonal Gegen ChAT	Kaninchen	1:750	120 min RT	Cy2 gt α rb
CRABP	monoklonal	Maus	1:1000	75 min RT	Cy3 d α m
Glutamin-Synthetase	monoklonal gegen Glutamin-synthetase	Maus	1:100	75 min RT	Cy3 d α m
Vimentin	monoklonal gegen Vimentin	Maus	1:100	75 min RT	Cy3 d α m
Transitin	monoklonal gegen Transitin	Maus	1:500	75 min RT	Cy3 d α m
Axonin-1	monoklonal gegen Axonin 1	Maus	1:250	75 min RT	Cy3 d α m
GABA	monoklonal gegen GABA	Maus	1:200	75 min RT	Cy3 d α m
Pax-6	monoklonal gegen Pax 6	Maus	1:500	75 min RT	Cy3 d α m
Islet-1	monoklonal gegen Islet 1	Maus	1:100	75 min RT	Cy3 d α m
Calretinin	polyklonal gegen Calretinin	Kaninchen	1:1500	75 min RT	Cy2 gt α rb
BrdU	monoklonal gegen BrdU	Maus	1:500	120 min RT	Cy3 rb α m

Tabelle 2: Primärantikörper: (Markierung der inneren Retina und der Proliferation)

Primärantikörper	Spezifität	Herkunft	Verdünnung	Inkubationsdauer	Sekundärantikörper
Cern 901	polyklonal gegen Hühnerrhodopsin	Kaninchen	1:1500	75 min RT	Cy2 gt α rb
Cern 906	polyklonal gegen rote und grüne Opsine des Huhns	Kaninchen	1:1500	75 min RT	Cy2 gt α rb
Rho 4D2	monoklonal gegen Rinderrhodopsin	Maus	1:1000	75 min RT	Cy3 d α m
Visinin	monoklonal gegen Visinin	Maus	1:500	75 min RT	Cy3 d α m

Tabelle 3: Primärantikörper (äußere Retina: Markierung der Photorezeptoren)

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Inkubationsdauer
Cy2 donkey-anti-mouse	Esel	1:200	60 min RT
Cy2 goat-anti-rabbit	Ziege	1:200	60 min RT
Cy3 donkey-anti-mouse	Esel	1:200	60 min RT
Cy3 goat-anti-rabbit	Ziege	1:200	60 min RT

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Doppelfärbungen		Verdünnung	Inkubationsdauer	Sekundärantikörper
rho4D, Cern 906	mk, pk	1:1000, 1:1500	75 min	Cy3d α m, Cy2 gt α rb
Cern 901 / 906, Pax-6	pk, mk	1:1000, 1:200	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Cern 901, Islet-1	pk, mk	1:1000, 1:100	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, Visinin	pk, mk	1:1000, 1:500	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, Islet-1	pk, mk	1:1000, 1:100	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, Pax-6	pk, mk	1:1000, 1:200	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, Glut. Syn	pk, mk	1:1000, 1:100	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, 3D10	pk, mk	1:1000, u.v.	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
Calretinin, Axonin-1	pk, mk	1:1000, 1:250	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
ChAT, Islet-1	pk, mk	1:750, 1:200	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
ChAT, GABA	pk, mk	1:750, 1:500	ü.N.	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
ChAT, CRABP	pk, mk	1:750, 1:1000	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m
ChAT, 3D10	pk, mk	1:750, 1:100	75 min	Cy2 gt α rb, Cy3 d α m

Tabelle 5: Doppelfärbungen

3.2.5 Proliferationsnachweis mittels BrdU-Einbau

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridins. Es wird zur Markierung proliferierender Zellen in Geweben verwendet. BrdU wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Durch einen spezifischen Antikörper gegen BrdU kann eine stattgefunden DNA-Synthese immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Es werden am gewünschten Kulturtag 25 µM BrdU (gelöst in PBS) zum Aggregationsmedium der Sphäroide gegeben. Nach 16 Stunden werden die Rosettensphäroide fixiert und anschließend am Kryostat geschnitten (s. 3.2.3). Für die Antikörperfärbung erfolgt zuerst eine 10-minütige Inkubation mit 500 µl 4 N HCl pro Objektträger, da für die Bindung des Antikörpers an BrdU eine Denaturierung der DNA notwendig ist. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS folgt die Antikörperfärbung nach dem in Punkt 3.2.6 beschriebenen Protokoll.

3.2.6 Apoptosenachweis mit Hilfe der TUNEL-Methode

Während der Apoptose (programmierter Zelltod) wird der DNA-Strang des Zellkerns durch Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Diese Strangbrüche können mit der TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) und aufgrund von Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Für die Zelltod-Detektion wird hier der *In Situ Death Detection Kit* von Roche verwendet. Die Kryostatschnitte werden mit einer Permeabilisierungslösung für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS folgt die Inkubation der Schnitte mit 50 µl terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase in 450 µl Markierungslösung (Nukleotid-Mischung). Dies findet in einer Feuchtkammer bei 37°C für 60 Minuten im Dunkeln statt. Anschließend wird noch zweimal mit 1x PBS gewaschen, bevor eine 3-minütige Zellkernfärbung mit DAPI folgt.

3.2.7 Cholinesterase-Reaktion nach Karnovsky und Roots

Die Cholinesterase-Reaktion wird nach der Methode von Karnovsky & Roots (1964) durchgeführt. Der Reaktionsmechanismus ist kurz folgender: Acetylthiocholin dient als Substrat. Außerdem enthält das Reaktionsmedium Kupfer-Ionen, die in Citratkomplexen gebunden sind. Das Acetylthiocholin wird durch das im Gewebe oder in einzelnen Zellen enthaltene Enzym Cholinesterase hydrolysiert. Das dabei freiwerdende Thiocholin reduziert Ferricyanid zu Ferrocyanid. Letzteres verbindet sich mit den Cu^{2+} -Ionen zum unlöslichen ‚Kupfer-Ferrocyanid‘ (= *Hatchett's Brown*). Dieses Endprodukt ergibt ein feines kupferrotbraunes Granulat genau dort, wo die Enzymaktivität stattgefunden hat.

Für die Färbung werden die Schnitte bei 37°C getrocknet und anschließend in einer Standkuvette zweimal in Tris-Maleat-Puffer für 10 Minuten gewaschen. Die Reaktionslösung muss unter Rühren im Becherglas stets frisch angesetzt werden.

ATC	(Acetylthiocholinjodid dient als Substrat)
0,1M Tris-Maleatpuffer (pH 6,0)	
0,1 M Na-Citrat	tropfenweise zugeben
30 mM CuSO ₄	
5 mM K ₃ Fe(CN) ₆	
10 ⁻² M iso-Opma	(hemmt BChE), tropfenweise zugeben

Tabelle 6: Zusammensetzung der Karnovsky/Roots Reaktionslösung und Reihenfolge des Ansetzens.

Die Inkubation in der Färbelösung erfolgt vorerst für eine Stunde bei 37°C. Um ein ‚Überfärben‘ zu verhindern, muss hier eine mikroskopische Kontrolle erfolgen. Bei zu geringem braunen Niederschlag muss weiter inkubiert werden. Die Inkubationsdauer hängt vom Gewebetyp und dessen Dicke ab (1 bis 4 Stunden). Nach zwei Waschschritten in dest. H₂O für 10 Minuten kann bei Bedarf eine Zellkernfärbung mit DAPI folgen. Der Kontrollansatz enthält kein Substrat. Es ist auch möglich, die Karnovsky-Roots Reaktion einer Antikörperfärbung folgen zu lassen.

3.2.8 Herstellung von Homogenaten für die Proteinchemie

Für die Herstellung von Gewebehomogenaten werden die Sphäroide am gewünschten Kulturtage entnommen und 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nach Abziehen der Waschlösung werden die Sphäroide im Homogenisationspuffer 30 s mit einer Ultraschallsonde homogenisiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 12 000 rpm für 10 Minuten. Der Überstand wird abgezogen und bis zur späteren Verwendung bei - 80°C aliquotiert gelagert.

3.2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) lässt sich der gesamte Proteingehalt einer Probe photometrisch messen. Die Proteinkonzentration steht in direkter Abhängigkeit zu der gemessenen Absorption. Zur Berechnung des Proben-Proteingehalts benötigt man eine BSA-Eichreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml). Für die Messung legt man 1 ml Bradford-Lösung in einer Kuvette vor, zu der man 100 µl Probe gibt und mischt. Anschließend wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Ab-

sorptionsmessung des Farbstoffkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm. Dieser Komplex entsteht durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G 250 an aromatische Aminosäuren. Bei Proteinkonzentrationen über 100 µg/ml ist es notwendig, die Probe mit dest. H₂O zu verdünnen. Der Proteingehalt der Probe wird dann in µg/ml angegeben.

Zusammensetzung der Bradford-Lösung:

0,01% Coomassie Brilliant Blue G 250

4,7% Ethanol

8,5% Phosphorsäure

3.2.10 Bestimmung der Acetylcholinesterase-Aktivität mit dem Ellman-Assay

Mittels des Ellman-Assays (Ellman et al. 1961) kann die Cholinesterase-Aktivität aus den Überständen der homogenisierten Gewebeproben bestimmt werden. Das Prinzip des Tests besteht darin, dass das Substrat Acetylthiocholin durch das Enzym Acetylcholinesterase in die Produkte Acetat und Thiocholin gespalten wird. In der Folgereaktion bildet das Thiocholin zusammen mit dem Ellmans Reagenz DTNB (Dithiobisnitrobenzoesäure) einen gelben Farbstoff, der photometrisch bei 412 nm gemessen wird. Von den gewonnenen Überständen (siehe Punkt 3.2.4) muss zuerst die Gesamtproteinmenge bestimmt werden. Dies erfolgt mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) (siehe Punkt 3.2.10).

Die Bestandteile des Tests werden in der unten angegebenen Reihenfolge in die Küvette pipettiert und gerührt. Vor der Zugabe des Substrats ATC muss noch 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Die Messung folgt direkt nach der Zugabe des Substrats im Photospektrometer bei 412 nm alle 60 Sekunden, über eine Dauer von 8 Minuten.

Ellman-Puffer	: 370 µl
DTNB	: 30 µl
BChE-Inhibitor (iso-ompa)	: 50 µl
Probe	: 30 µl
ATC (Substrat)	: 20 µl

3.2.11 Ernten von Sphäroiden für eine RNA-Isolierung

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA werden die Sphäroide in Eppendorf-Gefäßen an den entsprechenden Kulturtagen gesammelt und das Medium abgezogen.

Die Sphäroide werden zweimal bei 4°C in DEPC - behandeltem PBS gewaschen. Das PBS wird nach einem kurzen Anzentrifugieren restlos abgezogen und die Rosettensphäroide werden bei -80°C aufbewahrt.

3.2.12 Isolierung der Gesamt-RNA

TRI-Reagent[®] - RNA / DNA / Protein Isolation Reagent

Die Proben (s. 3.2.11) werden auf Eis aufgetaut und 1ml TRI-Reagent pro 50 -100 mg Gewebeprobe zugegeben. Anschließend wird mit einer Ultraschallsonde homogenisiert. Es folgt eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur, um eine vollständige Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Zum Homogenat werden 200 µl Chloroform gegeben (pro 1 ml TRI-Reagent) und kräftig für 10 -15 Sekunden geschüttelt. Diese Mischung wird nach einer weiteren Inkubation von 2 -15 Minuten bei Raumtemperatur, bei 12000 rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert.

Das Ergebnis ist die Separation der Lösung in drei Phasen. Von unten beginnend, eine rote-organische (Phenol-Chloroform) Phase, die das Protein enthält, eine Interphase, die die DNA enthält und eine obere, farblose Phase, die die RNA enthält. Diese obere, wässrige Phase mit der RNA wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 500 µl Isopropanol (pro ml TRI-Reagent) zugegeben und gemischt. (Bei Bedarf die Interphase und organische Phase für weitere Isolation von DNA und Protein bei 4°C lagern).

Dann wird die Probe für 5 -10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die RNA fällt als Pellet aus. Der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet mit 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Entfernen des Überstands, wird das Pellet an der Luft getrocknet. Zum getrockneten RNA-Pellet wird am Ende 70 -100 µl nukleasefreies (DEPC) Wasser hinzugefügt. Die Probe wird resuspendiert bis sich das RNA-Pellet gelöst hat und bei -20°C gelagert.

Es folgt die photometrische Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA- Probe.

Zur Bestimmung der RNA bzw. DNA Konzentration werden die Proben 1:30 in 1 M Trispuffer HCl (pH 9,5) verdünnt. Die Messung des Nukleinsäuregehaltes erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine weitere Messung bei 280 nm ermöglicht die Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren in der Probe. Mit Einbeziehung des Verdünnungsfaktors lässt sich der jeweilige RNA- bzw. DNA-Gehalt aus den erhaltenen OD-Werten berechnen.

Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

RNA-Konzentration:

Gemessener OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x Faktor für RNA (40) = x µg RNA /ml

DNA-Konzentration:

Gemessener OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x Faktor für DNA (50) = x µg DNA /ml

Außerdem resultiert aus dem Quotienten, der bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessene OD-Werte, die Reinheit der RNA. Für die weiteren molekularbiologische Arbeiten sollten nur Proben mit einer Reinheit zwischen 1,7 und 2,1 verwendet werden.

3.2.13 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion ist die Kombination von zwei molekularbiologischen Methoden, um die differentielle Genexpression in Zellen und Geweben nachzuweisen. Im ersten Schritt, der RT-Reaktion wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) die zuvor aus einem Gewebe isolierte RNA, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA dient dann in einem zweiten Schritt als Matrizenstrang, um das gesuchte Gen über die Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren (*polymerase chain reaction*, PCR). Die Produkte der RT-PCR lassen sich gelelektrophoretisch nachweisen.

RT-Reaktion

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wird ausschließlich cDNA aus zellulärer mRNA synthetisiert. Dies geschieht mit Hilfe von Oligo-d(T₁₅)-Primern, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Die RT-Reaktion erfolgt hier mit Hilfe des *Reverse Transcription Systems* von Promega. Zuerst wird die gesamte RNA 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um die vorhandenen Sekundärstrukturen zu denaturieren. Der Reaktionsansatz für die RT-Reaktion setzt sich wie folgt zusammen:

Premix:	(einfache Menge)
Gesamt-RNA (denaturiert)	2 µg
25mM MgCl ₂	4 µl
10 x Reverse Transkriptionspuffer	2 µl
10mM dNTP's	2 µl
RNasin	0,5 µl
Oligo-d(T ₁₅)-Primer	1 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,75 µl

Mit nukleasefreiem Wasser wird auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Es folgt eine Inkubation von einer Stunde bei 42°C, in der die cDNA synthetisiert wird. Der anschließende, letzte Inkubationsschritt von 5 Minuten bei 95°C, dient der Denaturierung der Sekundärstrukturen dieser neu synthetisierten cDNA. Die Produkte der RT- Reaktion werden mit nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

PCR-Amplifikation

In der Polymerase-Kettenreaktion wird mit Hilfe einer Polymerase in aufeinander-folgenden Zyklen das Ausgangsprodukt exponentiell vervielfältigt (amplifiziert). Ein PCR-Prozess besteht aus 12 bis 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Im ersten Schritt wird die zu amplifizierende cDNA denaturiert.

Anschließend kommt es im zweiten Schritt zur Anlagerung von Oligonukleotid-Primern (*annealing*), die den dritten Schritt, die Synthese von cDNA-Strängen (Elongation) ermöglicht. Diese Schritte werden in mehreren Zyklen nacheinander durchlaufen (Amplifikation) und so können geringste Mengen an Ausgangs-DNA nachgewiesen werden.

Die aus der RT-Reaktion erhaltenen Proben, werden in die nachfolgende Reaktion eingesetzt:

Premix:	(einfache Menge)
cDNA	10 µl
10 x Reverse Transkriptionspuffer	5 µl
25 mM MgCl ₂	3.75 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
sense Primer (50 pmole)	0,5 µl
antisense Primer (50 pmole)	0,5 µl
H ₂ O	28,75 µl
Taq Polymerase (2,5 units)	0,5 µl

Die Temperatur und die Dauer für die Anlagerung der Primer (*annealing*), sowie die Anzahl der Zyklen richtet sich nach den spezifischen Primern, deren Länge und Sequenz (siehe nachfolgende Tabelle 7).

	<i>Annealing</i> temperatur	Zyklenanzahl
GAPDH	55°C	30
ChAT	60°C	30
Stäbchenopsin	60°C	30
Rotes Opsin	60°C	30
AChE	55°C	30

Tabelle 7: Annealingtemperatur und Zyklenzahl für spezifische Primer der jeweiligen Gene

Das PCR-Produkt kann durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion werden 10 µl des PCR-Produkts auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen (dazu wird für ein Gelvolumen von 60 ml, 0,9 g Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht). Zum Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA werden 1,5 µl Ethidiumbromid zur Gel-Lösung gegeben. Nach dem Auspolymerisieren des Agarosegels werden die einzelnen PCR-Produkte aufgetragen und bei 90 Volt für eine Stunde aufgetrennt.

Die Länge des PCR-Produkts kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

3.2.14 Dokumentation und Bildbearbeitung

Die Dokumentation der Agarosegele erfolgt mit Hilfe eines UV-Leuchttisches in einer Dunkelkammer, in der oben eine Digitalkamera befestigt ist. Die aufgenommenen Bilder werden digital an einen Computer weitergeleitet und dort bearbeitet.

Die Dokumentation der histologischen Präparate erfolgt an einem Zeiss Axiophot mit Nomarski und Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung. Die digitalen Bilder werden mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit dem ‚Diskus-Programm‘ am Mikroskop weiterbearbeitet.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Rosettensphäroide in Abhängigkeit vom Alter der embryonalen Retina

Im ersten Teil der Arbeit wird die Entwicklung und Differenzierung der Rosettensphäroide in Abhängigkeit vom Alter der präparierten embryonalen Retina untersucht. Grundlage der Fragestellung war die Beobachtung von zwei verschiedenen Entwicklungsrichtungen bei den kultivierten Rosettensphäroiden.

4.1.1 Morphologische Unterschiede in der Rosettensphäroid-Entwicklung

Dissoziierte embryonale Retinazellen bilden im Aggregationsmedium auf dem Rotationschüttler Reaggregate. Diese verändern sich im Laufe ihrer meist 15-tägigen Kultivierung sowohl in der Größe als auch in ihrer Form auf charakteristische Weise. Um diese Veränderungen genauer zu untersuchen wurden zunächst alle 2 Tage aus den Kulturschalen Sphäroide entnommen und in konkaven Objektträgern lichtmikroskopisch dokumentiert (Abb. 14). Beginnend am Tag zwei der Kultivierung von E5 und E6-Retrina Rosettensphäroiden sind die Sphäroide klein und meist leicht oval mit einer Länge von durchschnittlich 100 -170 μm . Nach zwei weiteren Tagen in Kultur wird ihre glatte, runde Oberfläche durch kleine Aufwölbungen durchbrochen, die dann bis zum Tag 8 der Kultivierung zu großen Beulen auswachsen. Die Rosettensphäroide zeigen zwischen K7 und K8 eine typische, beulenförmige Oberflächenstruktur mit einer durchschnittlichen Länge von 250-400 μm . Danach verschwinden die Ausstülpungen wieder, die Sphäroide runden sich ab und sind ab K12 mit einer Größe von 200-300 μm ausdifferenziert (Abb. 14, 15). Die großen ‚Beulen‘ an der Oberfläche der Rosettensphäroide zwischen Kulturtag 6 und 8 sind IPL-Bereiche. Diese IPL-Bereiche wandern im Verlauf der Kultivierung im Sphäroid nach innen, und ihr Anteil an der Gesamtsphäroidfläche wird geringer. Dies wird durch DAPI gefärbte Kryostatschnitte dokumentiert und bestätigt. Die Rosetten sind ab Kulturtag 3 und 4 in zunehmender Größe deutlich zu erkennen.

Bei der Präparation von Retina aus 5 bis 5,5 Tage alten Embryonen (Hamburger/Hamilton Stadium 26 und 27) zeigt sich schon in der Kulturschale ein von IPL-Bereichen dominiertes Rosettensphäroid-System (Abb. 16). Die großen IPL-Bereiche, welche die Beulen an der Sphäroidoberfläche bilden, bleiben von Kulturtag 6 bis Kulturtag 8 außen bestehen. Die Rosetten sind klein und nehmen deshalb auch einen geringeren Flächenanteil im Rosettensphäroid ein.

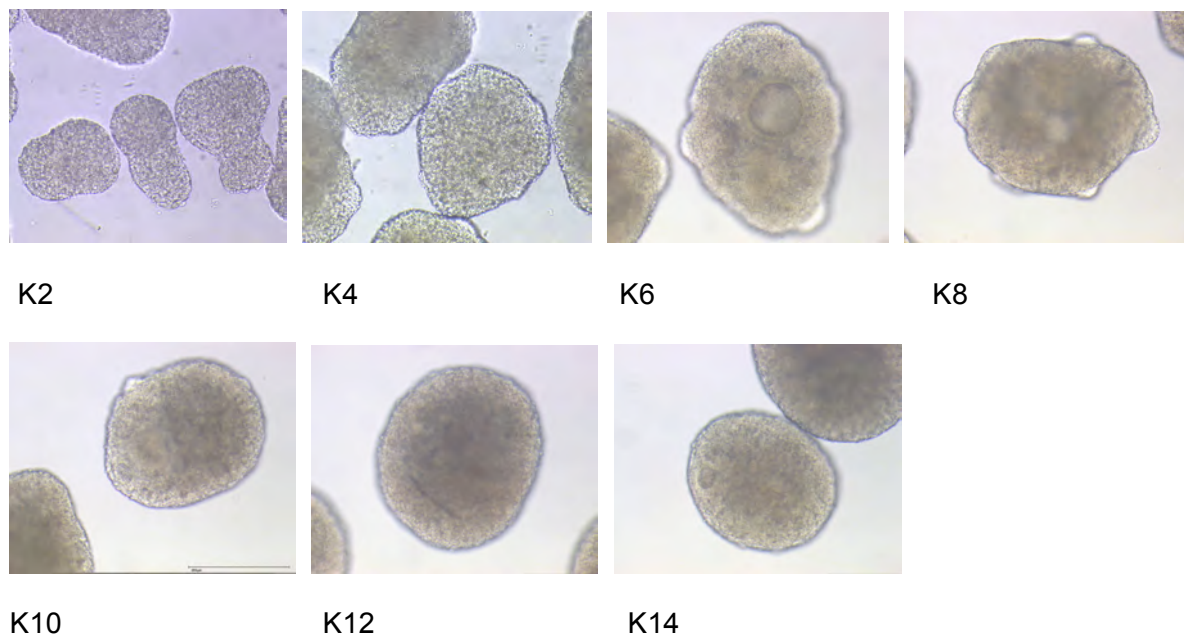


Abbildung 14: Rosettensphäroide in der Kulturschale. (E5 und E6 Retina). Maßstab: 200 μm . Kulturtag: 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14. Äußeres Erscheinungsbild der Rosettensphäroide während der Kultivierung jeden 2. Tag beim Medienwechsel.

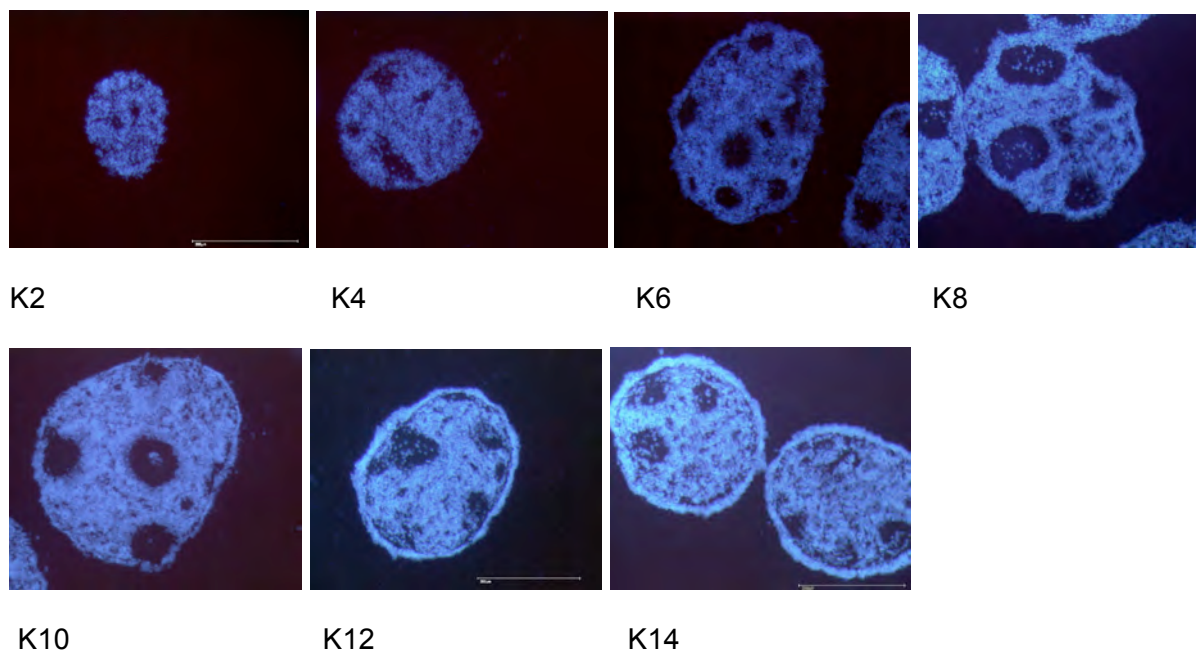


Abbildung 15: IPL-Entstehung in der Rosettensphäroidentwicklung aus E5 und E6 Retina. Kryostatschnitte von Rosettensphäroiden mit DAPI gefärbt. Kulturtag: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14. Maßstab: 200 μm .

Rosettensphäroide, die aus Tag 6 alter Retina präpariert wurden (Hamburger/Hamilton Stadium 29) zeigen ein anderes Erscheinungsbild. Diese Sphäroide werden von Rosetten domi-

nirt, die deutlich größer sind als in 5 Tage Retina-Sphäroiden (Abb. 17). Die außenstehenden, beulenartigen IPL-Bereiche sind auf einen kürzeren Zeitraum begrenzt, meist nur auf Kulturtag 6 und wesentlich kleiner als bei der E5 Retina Präparation. Ihr Flächenanteil an der Gesamtsphäroidfläche ist geringer, wie auch ihre Anzahl im Rosettensphäroid. Die Sphäroide runden sich schneller ab und die runden IPL-Bereiche liegen früher zentral. Insgesamt nimmt der Anteil der IPL-Fläche bezogen auf die Gesamtsphäroidfläche ab.

Für die Überprüfung der an den ‚whole mounts‘ beobachteten Unterschiede wurden aus vielen ausschließlichen E5 und E6 Retina Präparationen Kryostatschnitte von Kulturtag 4, 6 und 8 der Sphäroide hergestellt und mit DAPI angefärbt. Zwischen Kulturtag 4 und 8 ist der Flächenzuwachs der plexiformen Bereiche und der Rosetten am größten. Diese Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und vermessen. Die Vermessung der DAPI-gefärbten Schnitte bestätigte die auffallenden Unterschiede, der ganzen Sphäroide (‚whole mounts‘) in den Kulturschalen. Die statistische Auswertung des durchschnittlichen Anteils von plexiformen Schichten an der Gesamtsphäroidfläche, zeigte bei den E5 Retina-Sphäroiden eine signifikante Erhöhung dieser plexiformen Bereiche im Gegensatz zu den E6 Retina-Sphäroiden (Abb.18, 19).

‚Whole mounts‘

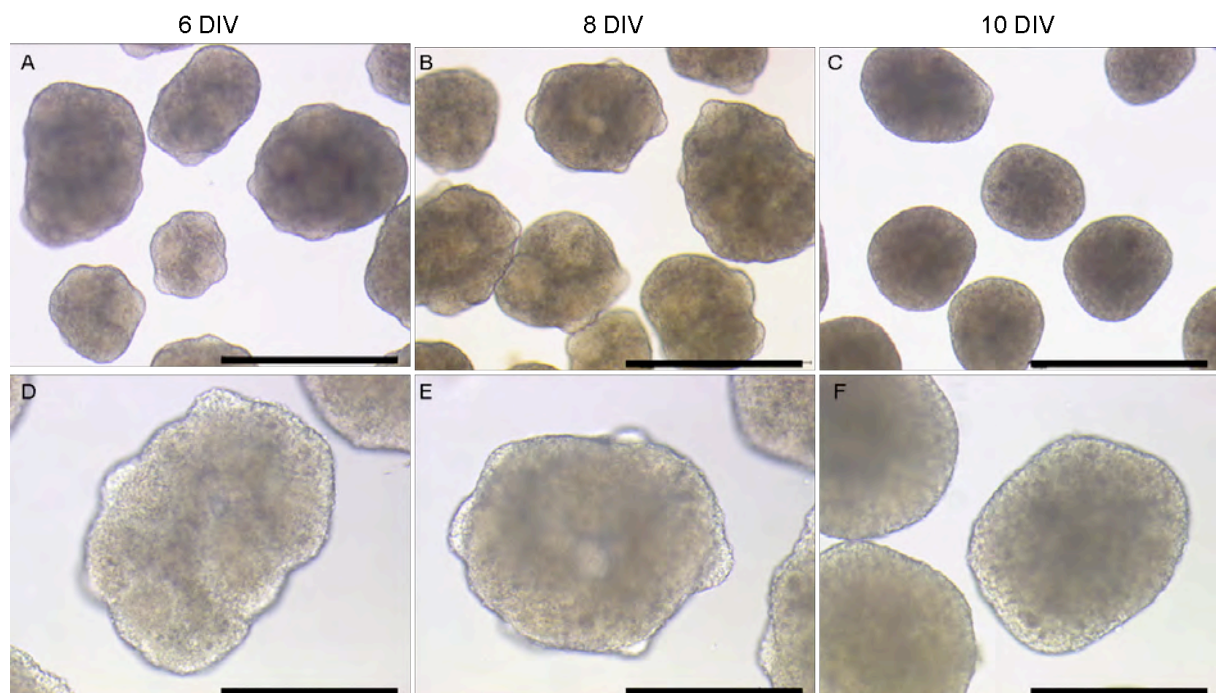


Abbildung 16: Die Rosettensphäroide aus den Retinae 5 Tage alter Embryonen werden von plexiformen Schichten dominiert. An den Kulturtagen 6 und 8 wird die Morphologie der Sphäroide durch die beulenartigen Ausbuchtungen (IPL-Bereiche) charakterisiert. Die Rosetten sind klein und in geringer Anzahl. Kulturtag: 6, 8, 10. Balken A - C: 200 µm, D - F: 100 µm.

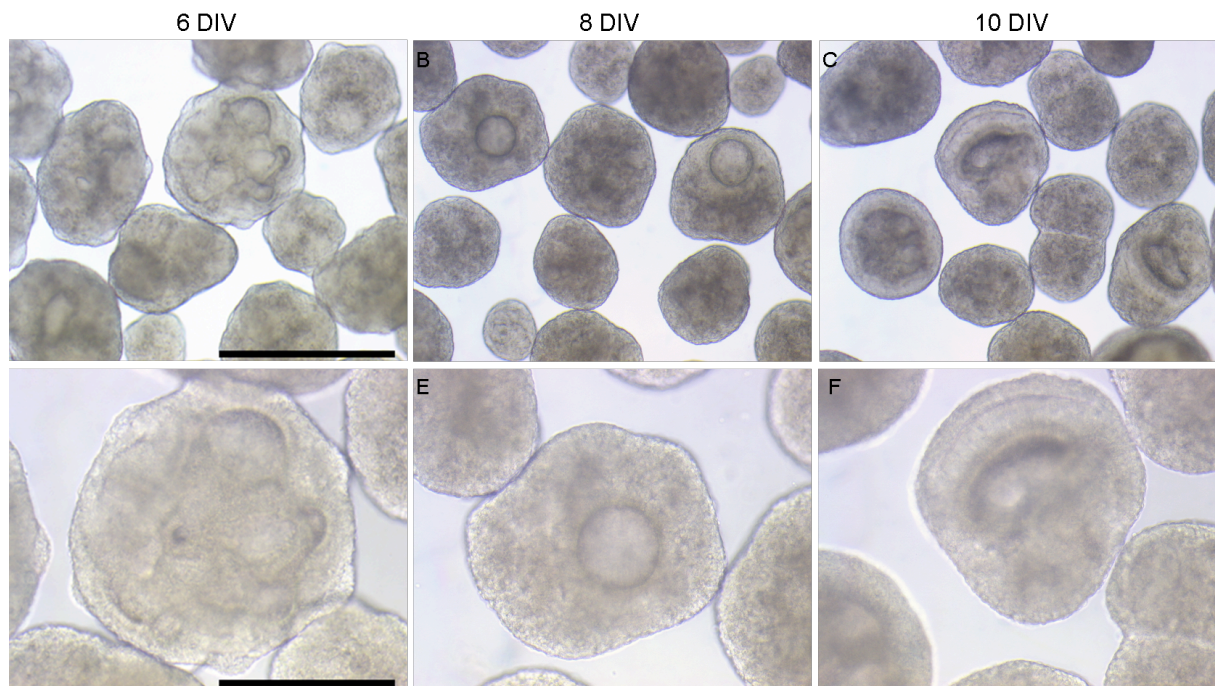


Abbildung 17: Die Rosettensphäroide aus den Retinae 6 Tage alter Embryonen werden von Rosetten dominiert. Über den gezeigten Kultivierungszeitraum charakterisieren zahlreiche und große Rosetten die Sphäroide. Die IPL- Ausbuchtungen sind nur an Kulturtag 6 zu erkennen. Kulturtag: 6, 8, 10. Balken A – C: 200 µm, D – F: 100 µm.

Hingegen nimmt bei den E6 Retina-Sphäroiden der durchschnittliche Anteil der Rosettenflächen am Gesamtflächenanteil der Sphäroide zu (Abb. 19). Die plexiformen Bereiche sind hier nicht so ausgeprägt (Abb. 18). Sowohl in der frühen (E5) Rosettenpräparation als auch in der älteren (E6) Präparation sind diese Charakteristika an Kulturtag 8 am deutlichsten.

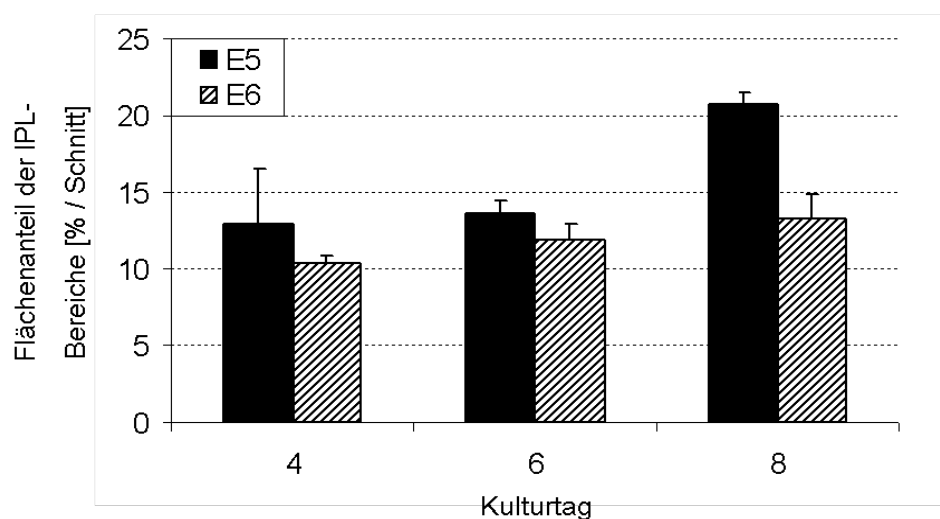


Abbildung 18: Verhältnis der Fläche der plexiformen Bereiche zur Gesamtsphäroidfläche. Statistische Auswertung des durchschnittlichen Anteils von plexiformen Schichten an der Gesamtfläche des Sphäroids gemessen an den Kulturtagen 4, 6, und 8. Die Ergebnisse aller ausgewerteten Schnitte wurden gemittelt und mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt.

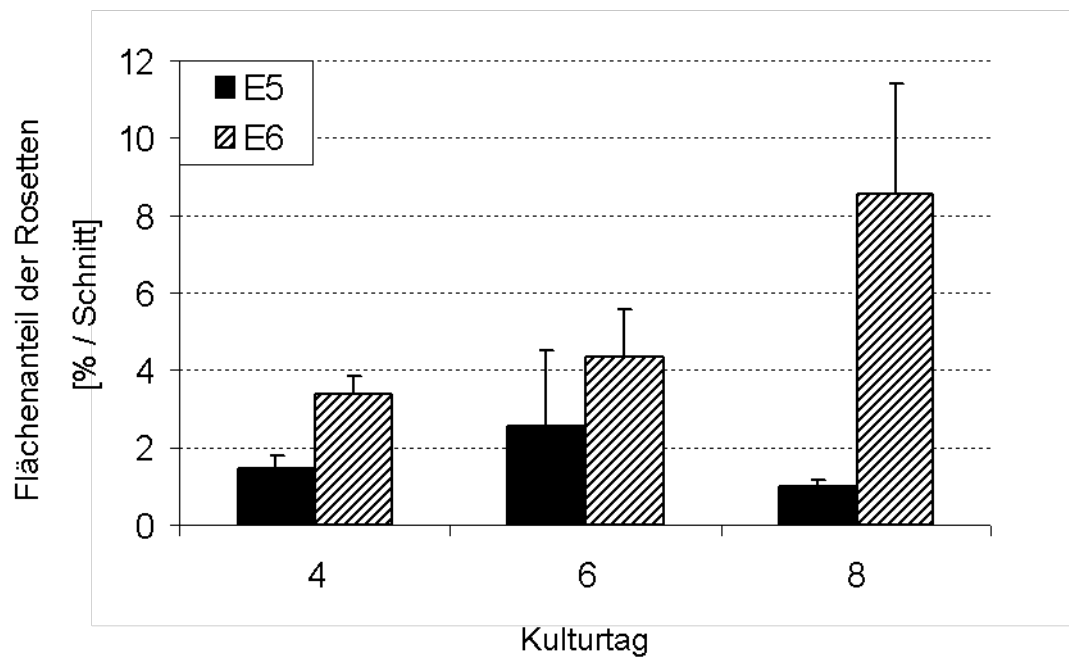


Abbildung 19: Verhältnis der Fläche der Rosetten zur Gesamtsphäroidfläche. Statistische Auswertung des durchschnittlichen Anteils von Rosetten an der Gesamtfläche des Sphäroids gemessen an den Kulturtagen 4, 6, und 8. Die Ergebnisse aller ausgewerteten Schnitte wurden gemittelt und mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt.

4.1.2 Entwicklung der Visinin- und Calretinin-Expression in Rosettensphäroiden aus Retinae 5 oder 6 Tage alter Embryonen im Laufe der Kultivierung.

Im nächsten Schritt wurden die beobachteten Unterschiede bei der frühen Retina Präparation im Gegensatz zur älteren Retina Präparation auch histologisch anhand von Antikörperfärbungen untersucht.

Um die Entwicklung der Photorezeptoren und der ONL in den Rosettensphäroiden verschiedenen alter Retinae zu vergleichen, wurde einerseits der Antikörper Visinin verwendet. Beim Huhn handelt es sich bei diesem Protein um ein dem Recoverin der Säugetiere homologes Protein das in allen Photorezeptoren exprimiert wird (Yamagata et al. 1990, Fischer et al. 2008). Alle postmitotischen Photorezeptoren zeigen eine Visinin Expression (Bruhn & Cepko 1996). Visinin ist ein Marker für Photorezeptoren und deren Vorläuferzellen. Andererseits sollten ein Großteil der INL-Zellen mit dem Antikörper Calretinin vergleichend dargestellt werden. Calretinin ist ein Calcium bindendes Protein. Es markiert Zellen, einige Tage nachdem ihre Differenzierung begonnen hat, jedoch in den meisten Fällen kurz vor ihrer Ausdifferenzierung. Der Hauptanteil der Calretinin-positiven Zellen in der embryonalen Retina sind die Amakrinzellen. Außerdem kann auch in der zukünftigen Photorezeptorschicht in einer frühen Phase Calretinin-Immunreaktivität beobachtet werden. Des Weiteren ist Calretinin auch ein Marker für Ganglienzellen und Horizontalzellen (Ellis et al. 1991). Speziell Calretinin

markiert neben den Zellkörpern auch deren Fortsätze und Projektionen (z.B. in die IPL). So können unterschiedliche Zellmorphologien wie auch entwicklungsabhängige Veränderungen charakterisiert werden.

Bei den fünf Tage alten Retina-Sphäroiden (Abb. 20) sind bereits an Kulturtag 2 viele Visinin-positive Zellen zu erkennen (Abb. 20C). Diese sind gleichmäßig über die Sphäroidfläche verteilt, wobei kleine Rosettenkeime schon zu erkennen sind. Die Photorezeptoren-Vorläufer befinden sich in großer Anzahl im intermediären Gewebe zwischen den plexiformen Bereichen und den Rosetten. Die ausdifferenzierten Visinin-positiven Photorezeptoren sind in die hier kleineren Rosetten eingewandert (Abb. 20 C). Auch die Calretinin positiven Zellen sind ab Kulturtag 2 in geringer Menge zu erkennen (Abb. 20 B). Im Verlauf der Kultivierung verteilen sie sich gleichmäßig über die Sphäroidfläche und markieren in charakteristischer Weise die IPL-Bereiche, indem sie kreisförmig um sie angeordnet sind und mit ihren Fortsätzen in dieselbigen projizieren. Die Calretinin positiven Zellen bleiben bis Kulturtag 10 in großer Menge in der INL, gleichmäßig über die Sphäroidfläche verteilt, vorhanden (Abb. 20 Q).

In den Rosettensphäroiden der sechs Tage alten Retinae (Abb. 21) sind am Tag 2 der Kultivierung mehr Visinin positive Zellen zu erkennen als bei Sphäroiden aus 5 Tage alten Retinae. Es sind auch größere Rosettenkeime durch Visinin markiert (Abb.21 C). Die Photorezeptoren der deutlich größeren Rosetten werden ab Kulturtag 4 bis Tag 10 durch Visinin-Expression gekennzeichnet. Bei der Calretinin-Expression der 6 Tage Rosettensphäroide (Abb. 21) zeigt sich ein charakteristischer Unterschied zu den Tag 5 Sphäroiden. Die ersten Calretinin positiven Zellen sind auch an Kulturtag 2 zu erkennen (Abb.21 B). An Tag 4 jedoch sind zusätzlich zu den Calretinin markierten INL-Zellen, deutlich Calretinin positive Zellen in der ONL der Rosetten zu erkennen (Abb. 21 F). Die zukünftigen Photorezeptoren der Rosetten sind dann sowohl Visinin als auch zum Teil Calretinin positiv. Diese Calretinin-Expression in der zukünftigen ONL ist an Tag 6 der Kultivierung fast verschwunden (Abb 21 J). An Kulturtag 8 erscheinen direkt anschließend an die OPL, die ersten Calretinin positiven Zellen mit horizontalen Fortsätzen (Abb.21 N). Diese Calretinin positiven Zellen bilden an Kulturtag 10 eine deutliche Horizontalzellschicht in der INL, direkt anliegend an der äußeren plexiformen Schicht (s. Pfeil Abb.21 U).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sogenannte, ‚E5 Rosettensphäroide‘ IPL - dominante Sphäroide sind. Die inneren plexiformen Bereiche prägen hier über einen längeren Entwicklungszeitraum das Aussehen und die Histologie der Sphäroide. ‚E6-Rosettensphäroide‘ hingegen sind Rosetten-dominante Sphäroide, ihre Rosetten sind sehr groß, wogegen die IPL-Bereiche in Menge und Fläche zurücktreten.

Visinin / Calretinin: E5 – Präparation

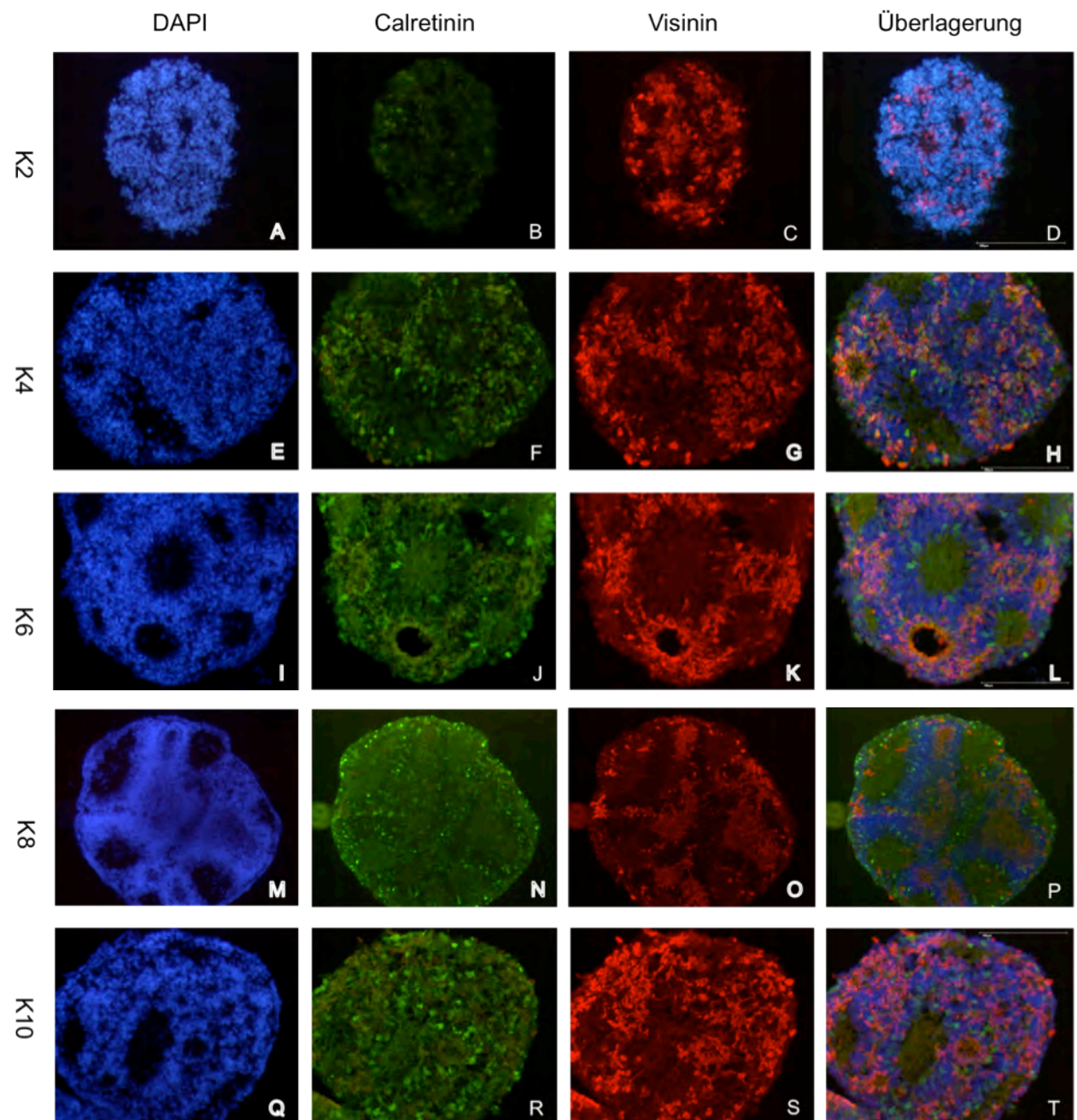


Abbildung 20: Entwicklung der Visinin- und Calretinin-Expression in Rosettensphäroiden aus Retinae 5 Tage alter Embryonen im Laufe der Kultivierung. A-C: Für den gleichzeitigen Nachweis von Visinin und Calretinin wurden neben einer Kernfärbung mit DAPI (A) immunhistochemische Färbungen mit Calretinin (B) und Visinin (C) an Gefrierschnitten von 2 Tage alten Sphäroiden durchgeführt. D: Überlagerung von Kern- und Antikörperfärbung aus A, B und C. Dasselbe an K 4: E-H, K 6: I-L, K 8: M-P und K 10: Q-T.

Visinin / Calretinin: E6 – Präparation

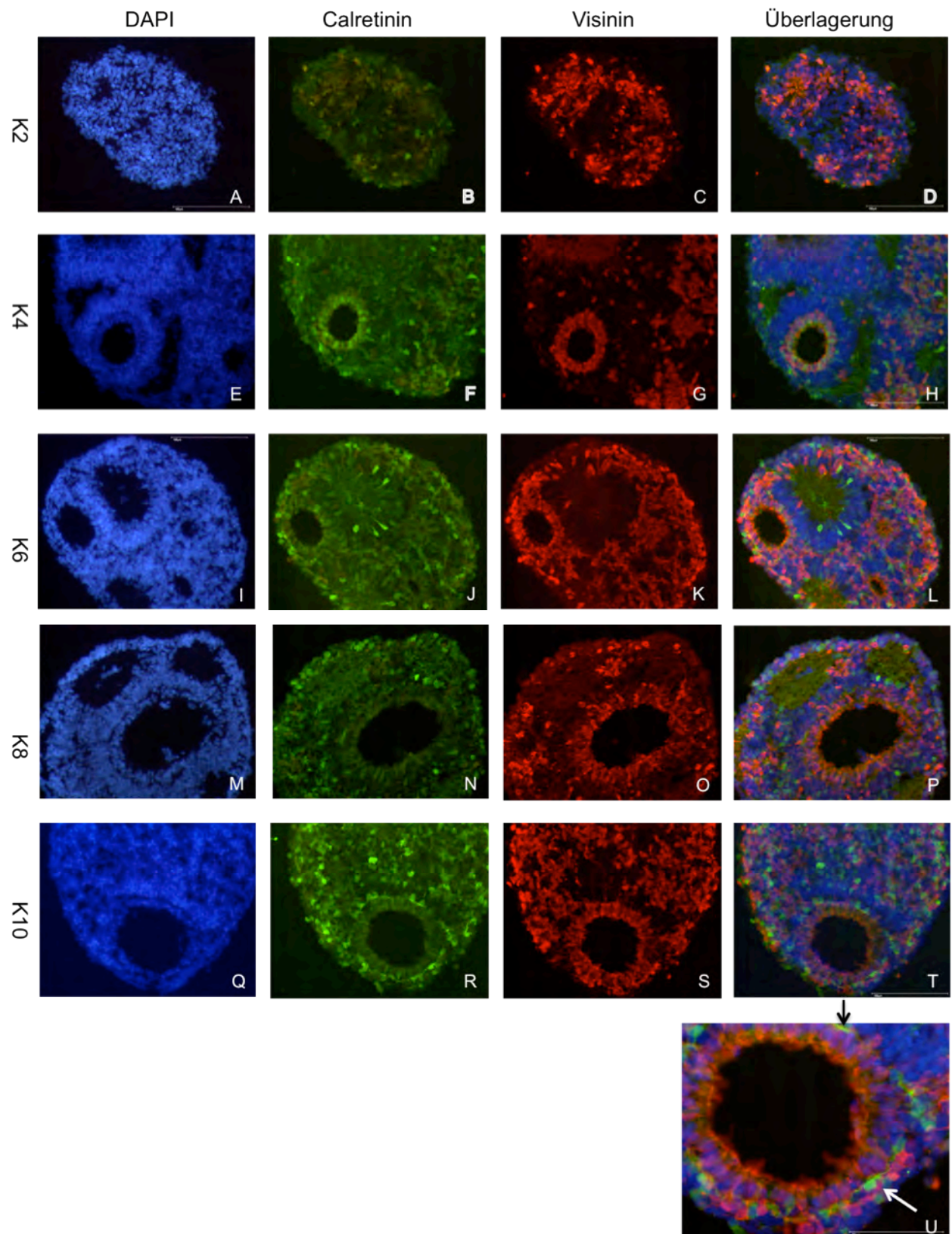


Abbildung 21: Entwicklung der Visinin- und Calretinin Expression in Rosettensphäroiden aus Retinae 6 Tage alter Embryonen. Färbungen s. Abb. 21. Vertikal: Kulturtage 2-10; horizontal: Kernfärbung (blau), Calretinin (grün) und Visinin (rot), Überlagerung. U, vergrößerter Ausschnitt von T: Horizontalzellen (weißer Pfeil).

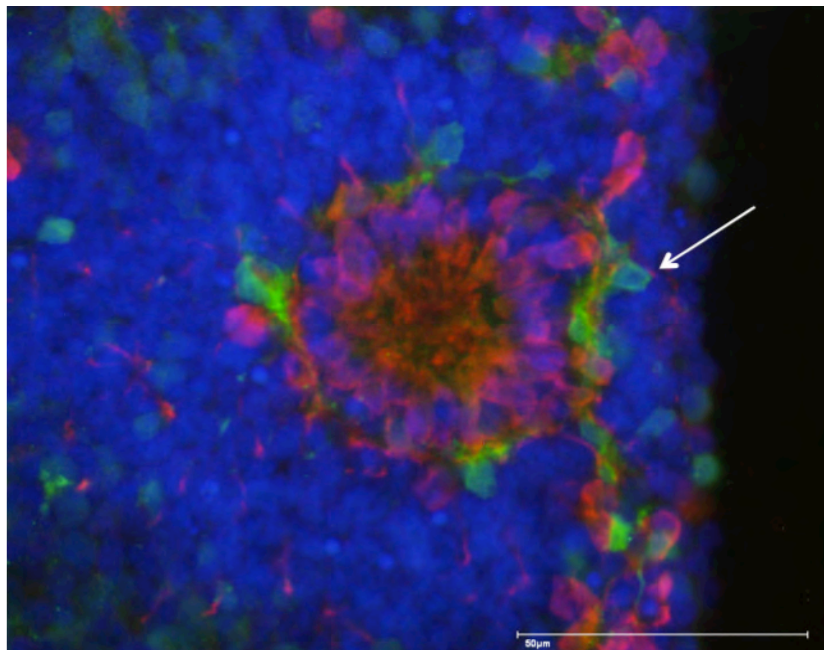
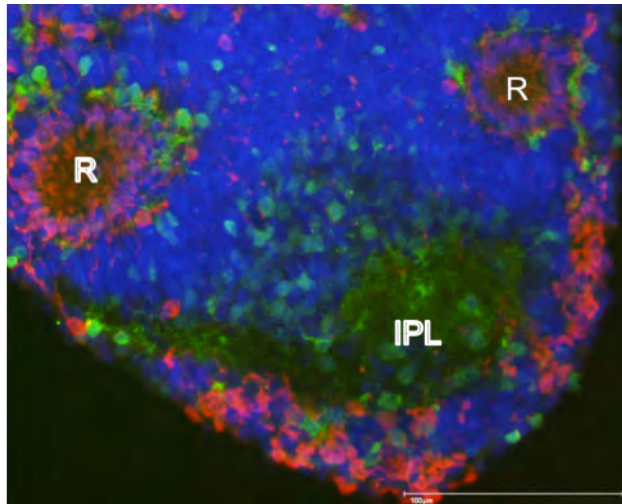


Abbildung 22: Bildung einer Horizontalzellschicht in E6-Retina-Sphäroiden. Nachweis von Horizontalzellen mit Calretinin (grün) an Sphäroiden aus E6-Retina und Bildung der Horizontalzellschicht. Pfeil: Horizontalzellen an der Grenze INL / OPL. Kulturtag 10. Visinin (rot), R: Rosette IPL: innerer, plexiformer Bereich. Unten: vergrößerter Ausschnitt von oben (Maßstab: 50 µm).

4.2 Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden

4.2.1 Morphologische Unterschiede der Rosettensphäroide nach der Glutamatbehandlung

Im zweiten Teil der Ergebnisse werden die Auswirkungen von Glutaminsäure (oder L-Glutamat) während der Kultivierung auf Rosettensphäroide vorgestellt. Grundlage für die Glutaminsäure oder Glutamatbehandlung waren die Beobachtungen von Reese et al. dass in der Frettschenretina *in-vivo* mit L-Glutamat eine spezifische Zellpopulation der inneren nukleären Schicht, die cholinergen Amakrinzellen entfernt werden können. Dadurch konnte die Entwicklung der inneren plexiformen Schicht und deren Stratifizierung durch diese spezifischen Amakrinzellen untersucht werden.

Basierend auf den Beobachtungen und Resultaten des ersten Ergebnisteils wurden für die Versuche mit Glutamatbehandlung hauptsächlich Embryonen nach Hamburger/Hamilton Stadium 26 und 27 oder Embryonaltag 5 für die Präparationen verwendet. Somit war eine plexiformlastige Rosettensphäroidrichtung garantiert, um die Auswirkungen des Glutamats auf die cholinerge Stratifizierung in der inneren plexiformen Schicht länger untersuchen zu können.

4.2.1.1 Abgerundete Sphäroide und reduzierte IPL- ‚Beulen‘ durch Glutamatbehandlung

Ausgehend von der normalen Rosettensphäroidentwicklung (beschrieben in Ergebnisteil 1), fällt während der Kultivierung bei den mit Glutamat behandelten Schälchen zuerst ab Kulturtag 6 das deutlich weniger verbrauchte Aggregationsmedium im Vergleich zu den Kontrollen auf. Dies ist anhand der pH-abhängigen Färbung des Mediums zu erkennen (s. Abb. 23).

Die nicht behandelten Proben (Kontrollen) weisen ein normal verbrauchtes hellrosa bis hell-oranges Medium auf. Bei den Kulturschalen mit behandelten Sphäroiden ist das Medium bei der 0,2 mM Glutamat-Endkonzentration (s. Mat./Meth. 3.2.2) dunkelrosa und bei der höchsten Glutamat-Endkonzentration von 0,4 mM violett-rot, d.h. es ist dem unverbrauchten Aggregationsmedium farblich sehr ähnlich.

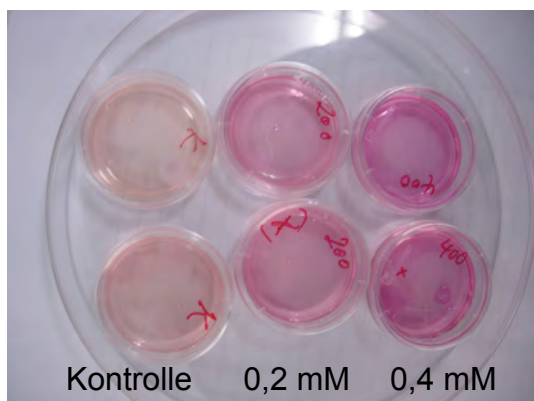


Abbildung 23: Unterschiedlich verbrauchtes Medium in den Kulturschalen an Kulturtag 8. Links: nicht behandelte Proben (Kontrolle). Behandelte Proben: Mitte: 0,2 mM und rechts: 0,4 mM (= Endkonzentration der Glutaminsäure in der Schale).

Lichtmikroskopisch lässt sich dann auch an den ganzen Sphäroiden, beginnend ab Kulturtag 5 und 6 auch morphologisch ein deutlicher Unterschied erkennen, der sich über die Kultivierungsdauer verstärkt. Die am Tag 6 charakteristisch beulenartig vorgewölbten IPL-Bereiche der Kontrollen sind in den mit einer Endkonzentration von 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroiden reduziert. Dieser Effekt verstärkt sich an Kulturtag 8. An den ‚*whole mounts*‘ der behandelten Kulturschalen sind nun kaum mehr IPL-Bereichs-Vorwölbungen zu sehen. Zudem sind in den behandelten Sphäroiden sehr wenig durchscheinende hellere IPL-Bereiche zu entdecken. Die Sphäroide sind fast gleichmäßig dunkel im Durchlichtbild. An Tag 10 der Kultivierung haben sich dann die Kontrollen auch fast vollständig abgerundet. Es sind noch einzelne durchscheinende, hellere IPL-Bereiche im Inneren der Sphäroide zu sehen.

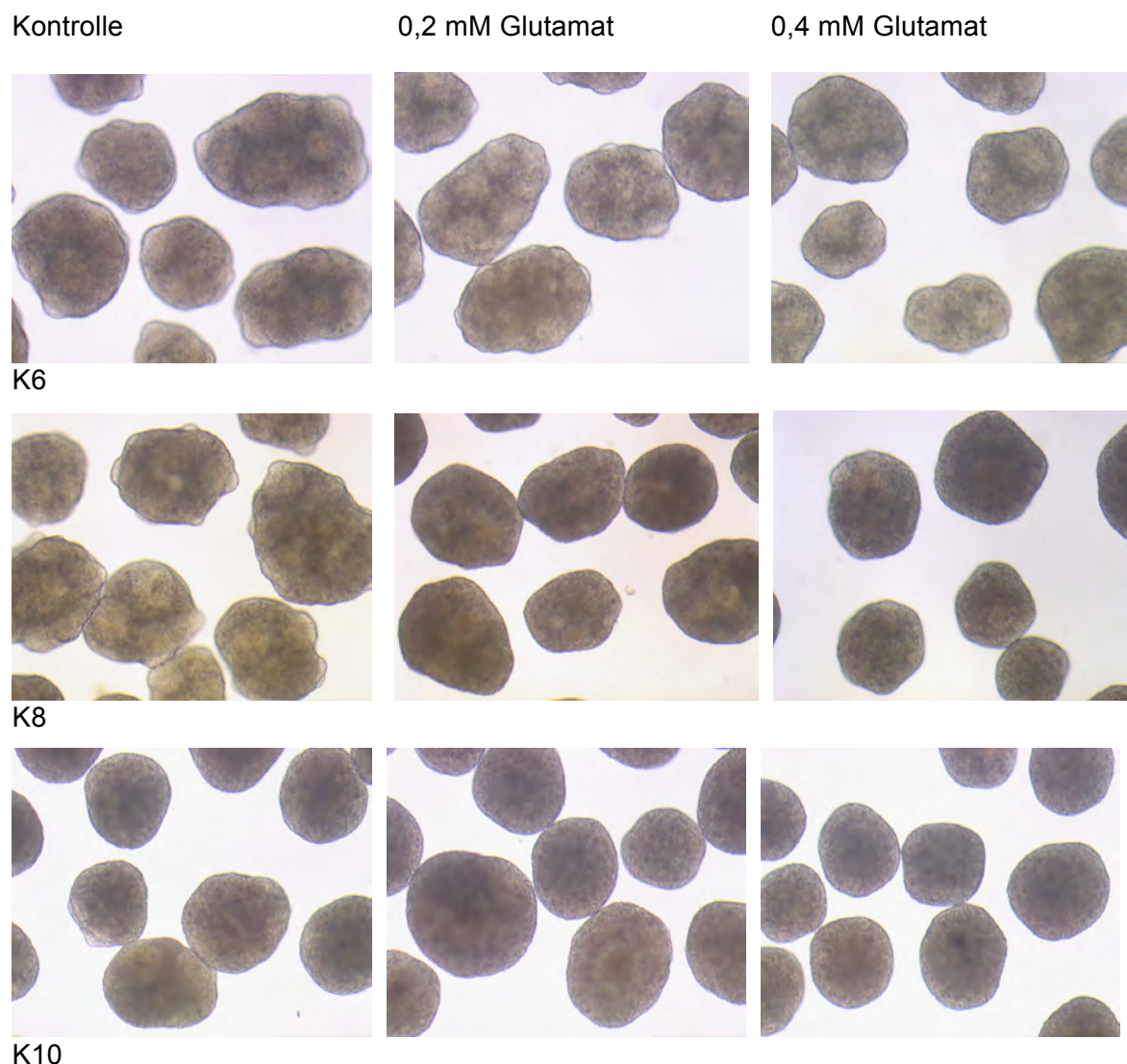
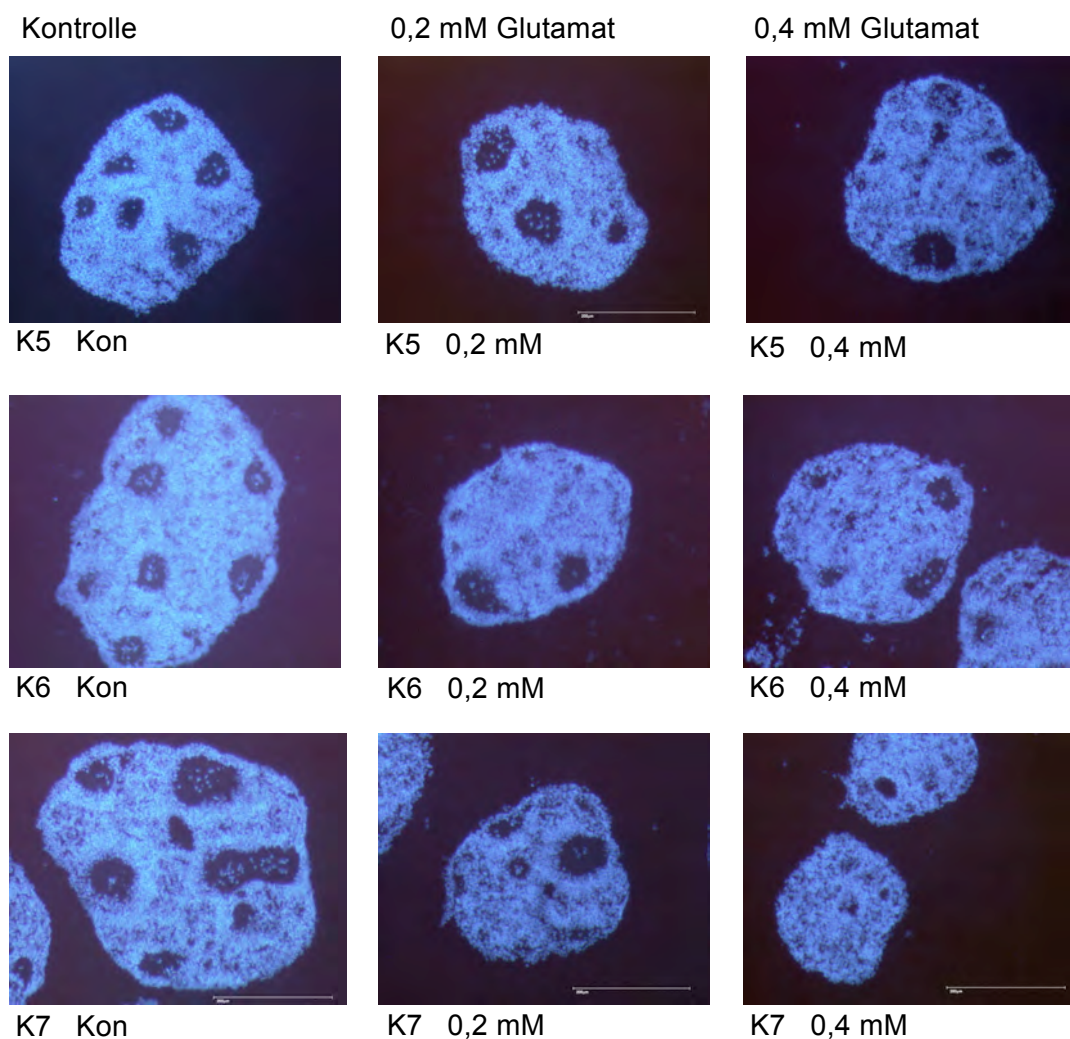


Abbildung 24: Morphologische Unterschiede zwischen Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden und nicht behandelten Proben an Kulturtag 6, 8 und 10 in der Kulturschale. Glutamat-behandelte Sphäroide runden sich ab Kulturtag 6 mit steigender Glutamat-Konzentration zunehmend ab. Die IPL- Ausbuchtungen sind nur noch an K 6 vorhanden. Endkonzentration: 0,2 mM und 0,4 mM Glutamat. Maßstab: 500 µm.

Bei den am stärksten Glutamat-behandelten Rosettensphäroide (0,4 mM) fehlen diese meist zentralen durchscheinenden Bereiche am ganzen Sphäroid („whole mount“) vollständig. Sie sind komplett abgerundet und erscheinen kompakt und dunkel. Wählt man eine Glutamatkonzentration um die Hälfte reduziert, also 0,2 mM, liegt das morphologische Erscheinungsbild der Rosettensphäroide, zwischen dem der nicht behandelten Sphäroide und den am stärksten behandelten Sphäroiden. Diese deutliche IPL-Bereichsreduktion ist in den „whole mounts“ an Kulturtag 8 und 10 (Abb.24) am markantesten.

Auch an den DAPI gefärbten Kryostatschnitten bestätigt sich diese Beobachtung (Abb.25). In den Schnitten ist die IPL reduzierende Glutamatwirkung deutlich ab Kulturtag 5 sichtbar. Am stärksten ausgeprägt ist sie bei einer Endkonzentration 0,4 mM in der Kulturschale. Histologisch zeigt sich über einen 15-tägigen Kultivierungszeitraum die fortschreitende Reduktion der IPL-Bereiche mit steigender Glutamatgabe. Der Anteil der plexiformen Bereiche an der Gesamtfläche des Sphäroids nimmt gleichmäßig ab.

Abbildung 25 (Legende S. 61)



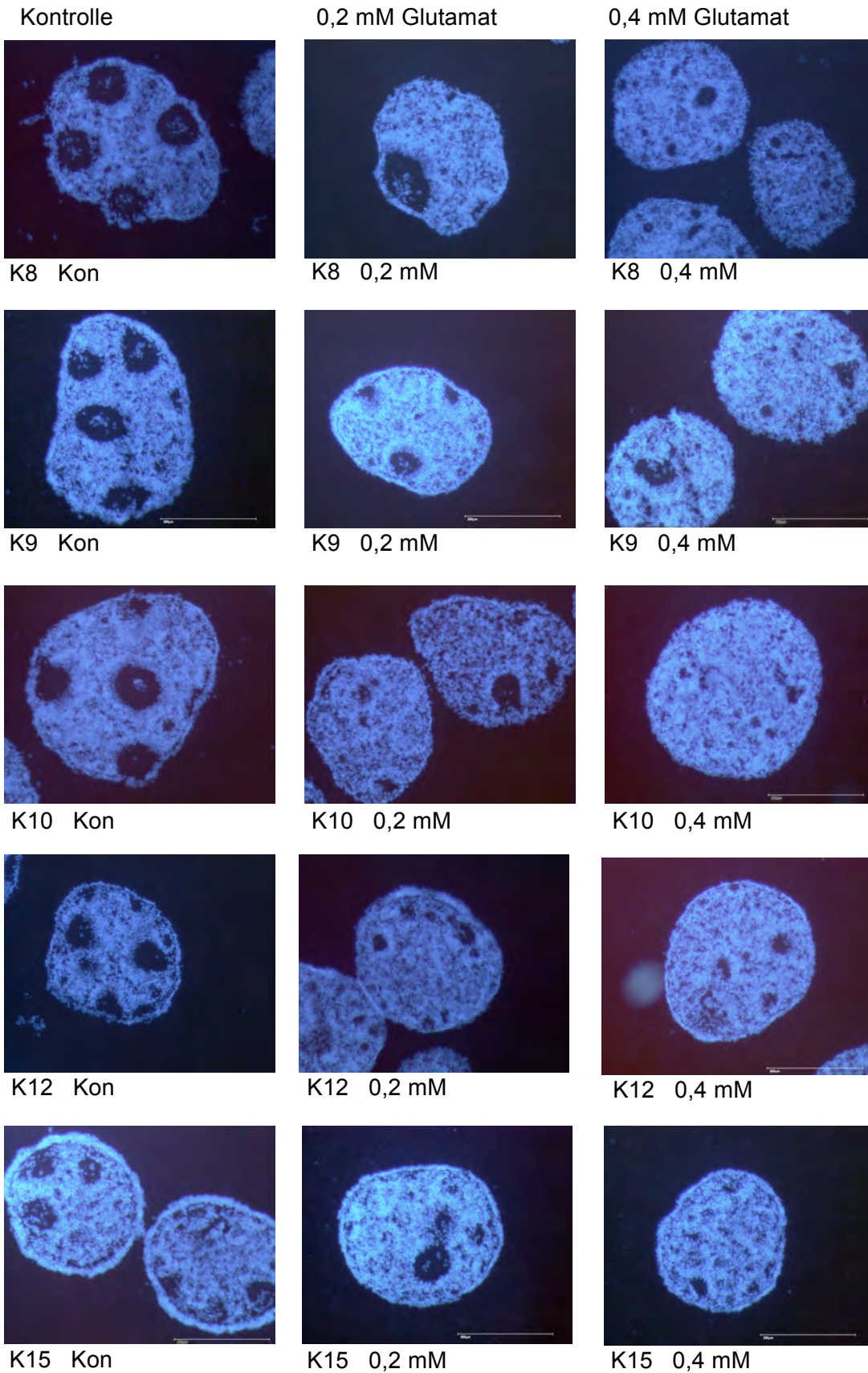


Abbildung 25: Zunehmende Reduktion der inneren plexiformen Bereiche bei Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden während der Kultivierung. DAPI-gefärbte Kryostatsschnitte von Kulturtag 5 bis 15 mit Kontrollen (links), 0,2 mM Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden (Mitte) und 0,4 mM behandelten (rechts). Maßstab: 200 µm.

Um dieses deutliche visuelle Ergebnis hinsichtlich der IPL-Reduktion zu bestätigen, wurden aus verschiedenen Versuchen DAPI-Schnitte von vielen unterschiedlichen Sphäroidkryostat-schnitten vermessen. Dazu wurden an jedem zweiten Kulturtag mit dem 10er Objektiv des Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen gemacht. An diesen Bildern wurden einerseits die charakteristisch runden IPL-Bereiche vermessen und zu einem Gesamtwert pro Sphäroid addiert. Andererseits wurde die dazugehörige Gesamtsphäroidfläche vermessen. Die IPL-Gesamtfläche wurde in Verhältnis zur Gesamtfläche des Rosettensphäroids gesetzt. Die statistische Auswertung der vermessenen zweidimensionalen Flächen bestätigt auch die an den ‚whole mounts‘ und an den DAPI-Schnitten beschriebenen Resultate (Abbildung 26).

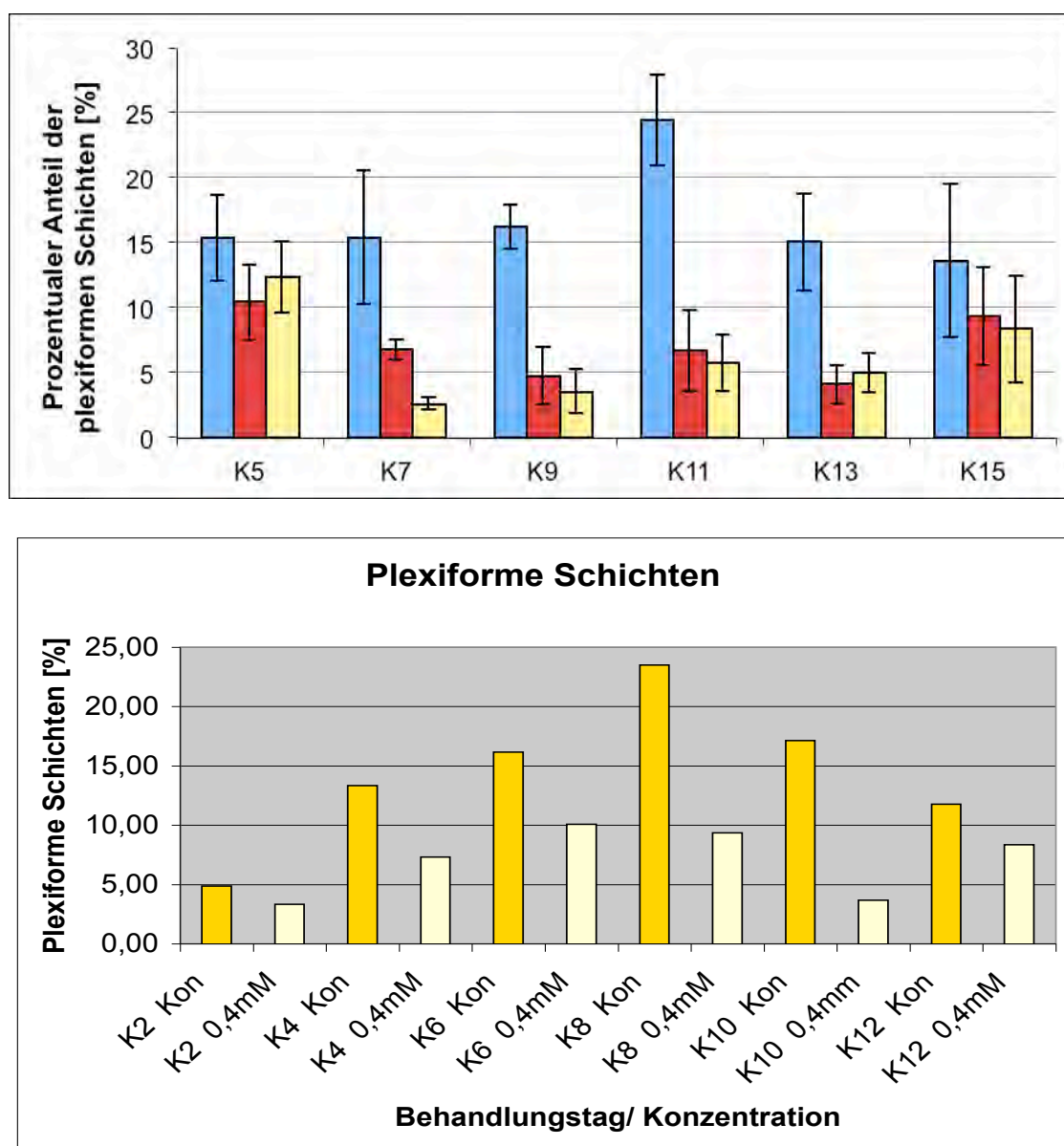


Abbildung 26: Prozentualer Anteil der IPL-Bereiche an der Gesamtsphäroidfläche: Glutamat-behandelte Rosettensphäroide haben stark reduzierten IPL-Bereiche. (an DAPI-Schnitten vermessen). Oben: Kontrolle: blau, 0,2 mM Glutamat: rot, 0,4 mM Glutamat: gelb. Unten: Kontrolle: dunkelgelb, 0,4 mM Glutamat: hellgelb.

Zusätzlich zur IPL-Gesamtflächenreduktion der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide war bei den verbleibenden IPL-Bereichen eine frühere Zentrierung ins Innere des Sphäroids zu beobachten.

Auch der ab Kulturtag 10 bei den Kontrollen am Rand auftretende schmale, umlaufende ple-xiforme Bereich (siehe Pfeil Abb. 25: Kon 15) war bei den am stärksten behandelten Sphäroiden (0,4 mM) fehlend. Bei den leichter behandelten (0,2 mM) war dieser randständige IPL-Bereich nur noch ansatzweise vorhanden (siehe Abb. 25, Kulturtag 10,12,15)

4.2.1.2 Zirkularität

Eine weitere Methode um die charakteristische Reduktion der beulenförmigen Ausstülpungen der IPL-Bereiche an den Kulturtagen 6 bis 8 nach der Glutamatbehandlung zu bestätigen, ist die Vermessung der Rundheit der Rosettensphäroide (Frohn 2009). Dies erfolgte mit Hilfe des Programms ‚ImageJ‘ und zeigte an Kulturtag 6 und 8 eine signifikante Erhöhung der Abrundung der Glutamat-behandelten Sphäroide (Abb. 27).

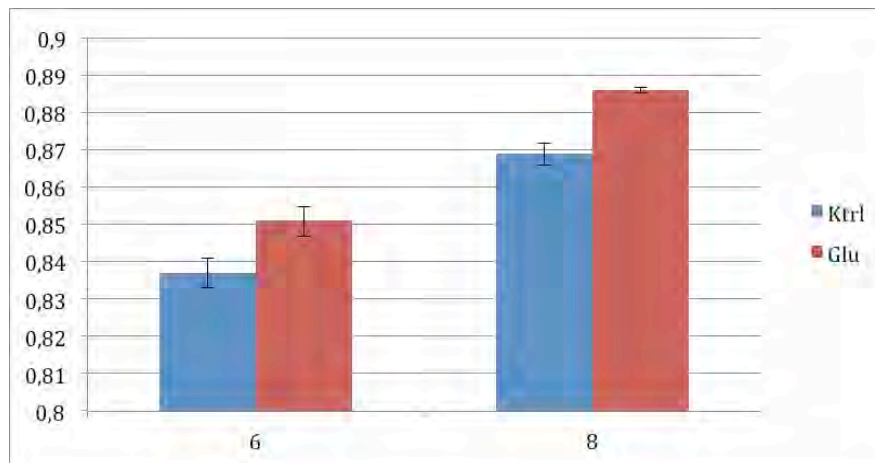


Abbildung 27: Die Zirkularität der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide ist an Kulturtag 6 und 8 signifikant höher als in den Kontrollen. Vermessen mit Image J. Kontrollen: blau. 0,4 mM Glutaminsäure: rot.

4.2.2 Die Proliferation wird an Kulturtag 6 und 8 durch Glutamat signifikant erhöht

Da Glutamat primär neurotoxische Eigenschaften besitzt, ist interessant, ob sich dieses auch auf die Proliferation im Rosettensphäroid-System negativ auswirkt. Im Gegensatz dazu sind aus der Literatur inzwischen viele Proliferationsfördernde und - regulierende Auswirkungen des Glutamats bekannt. Glutamat stimuliert beispielsweise die Proliferation der retinalen Progenitorzellen der Retina und die des Pigmentepithels (Martins et al. 2006, Uchida et al. 1998). Erhöhte Proliferation durch Glutamat wurde auch *in-vitro* an humanen, neuronalen Progenitor-Zellkulturen aus unterschiedlichen Gehirnregionen nachgewiesen (Luk et al. 2003, Brazel et al. 2005, Suzuki et al. 2006).

Um zu überprüfen, ob hier durch die Glutamatbehandlung die Proliferationsrate in den Rosettensphäroiden verringert oder erhöht wird, wurde eine BrdU-Einbaustudie durchgeführt. Hierzu wurden zunächst am fünften und am siebten Kulturtag 50 μ M BrdU zum Medium gegeben. Die Sphäroide wurden weitere sechzehn Stunden kultiviert und am jeweils sechsten und achten Tag fixiert (s.3.2.5). Die Kryostatschnitte wurden anschließend mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt (s.3.2.4).

Da bekannt ist, dass die Proliferationsrate in den Rosettensphäroiden die ersten fünf Kultur tage sehr hoch ist, wurden hier gezielt Kultur tage mit geringer werdender Proliferation ausgewählt.

Am Kulturtag sechs sind in der Kontrolle gleichmäßig viele Zellen durch den BrdU Antikörper markiert (Abb.28). Diese markierten Zellen verteilen sich gleichmäßig über den ganzen Sphäroidquerschnitt. Es proliferieren meist Zellen in den intermediären Bereichen des Rosettensphäroids, zwischen den runden IPL-Bereichen und die Rosetten. Der Querschnitt des mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroids weist am selben Tag deutlich mehr BrdU markierte Zellen auf als die Kontrolle. Sie liegen auch in den intermediären Bereichen. Die Proliferation ist durch die Glutamat-Behandlung deutlich erhöht.

Zwei Tage später, an Kulturtag acht sind in der Kontrolle weniger Zellen BrdU positiv als an Tag sechs. Die Proliferation sinkt in der normalen Sphäroidentwicklung mit zunehmender Differenzierung. Wie schon an Kulturtag sechs beobachtet ist die Anzahl der BrdU markierten Zellen im 0,4 mM Glutamisäure behandelten Sphäroidquerschnitt erhöht, jedoch nicht so stark wie an Tag sechs. Die Proliferation ist auch hier sichtbar erhöht. Die markierten Zellen befinden sich im intermediären Gewebe (Abb. 28).

Insgesamt wird durch die Glutamatbehandlung die Proliferation erhöht und der Proliferationszeitraum in der Entwicklung der Rosettensphäroide verlängert.

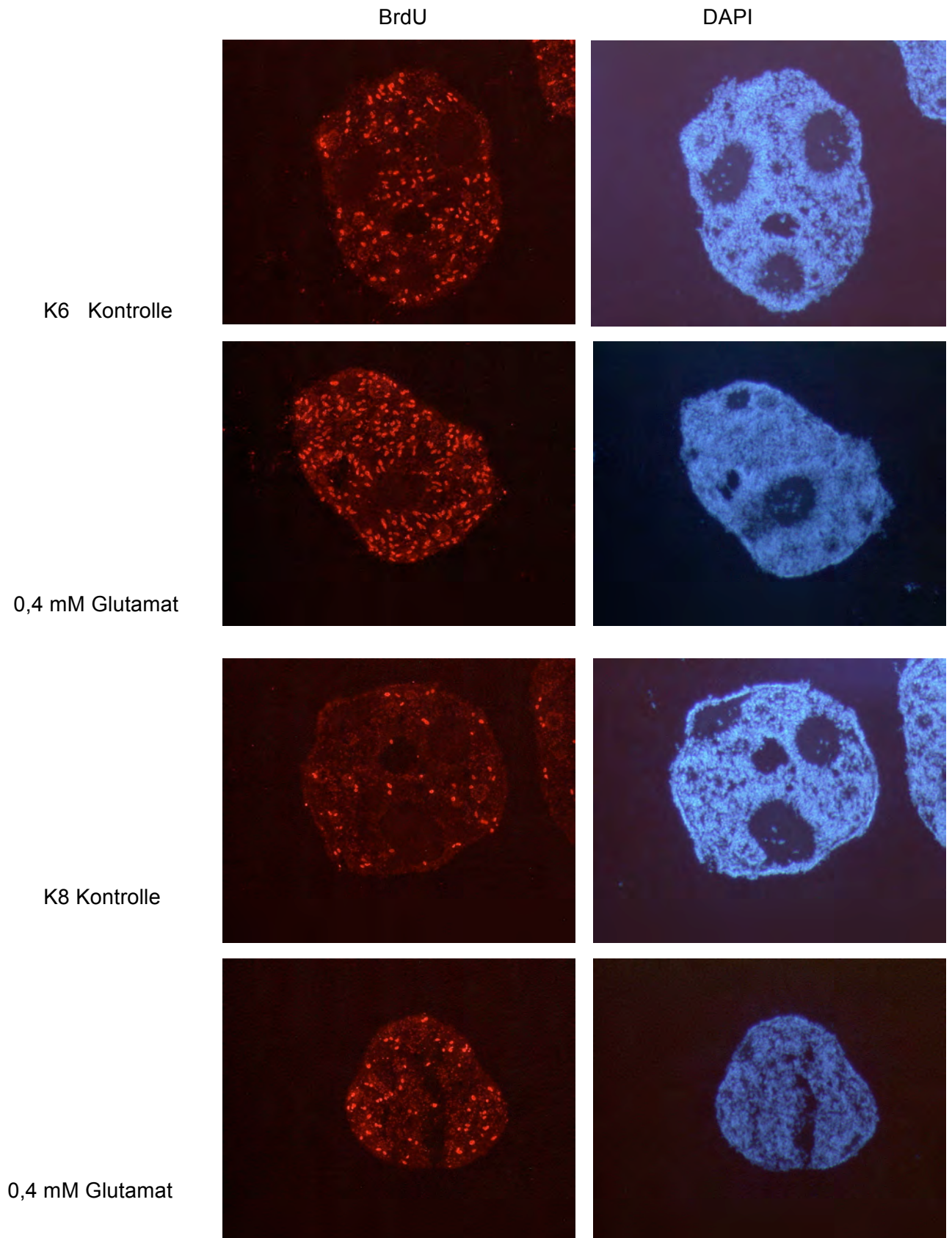


Abbildung 28: Erhöhte Proliferation in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtag 6 und 8. Färbung von Gefrierschnitten mit dem BrdU-Antikörper (links) und DAPI (rechts). Kulturtag 6 und 8, jeweils Kontrolle und 0,4 mM Glutaminsäure.

Um die an den BrdU gefärbten Schnitten beschriebenen Ergebnisse von K6 und K8 auf ihre Signifikanz zu überprüfen, wurde die DAPI markierte Gesamtzellzahl in einer $50\ \mu\text{m}^2$ Fläche gezählt. In derselben Fläche wurden auch die BrdU-positiven Zellen ausgezählt. Die erhöhte Proliferation der Glutaminsäure behandelten Sphäroide ist an Kulturtag sechs und acht signifikant, an Tag sechs jedoch höher.

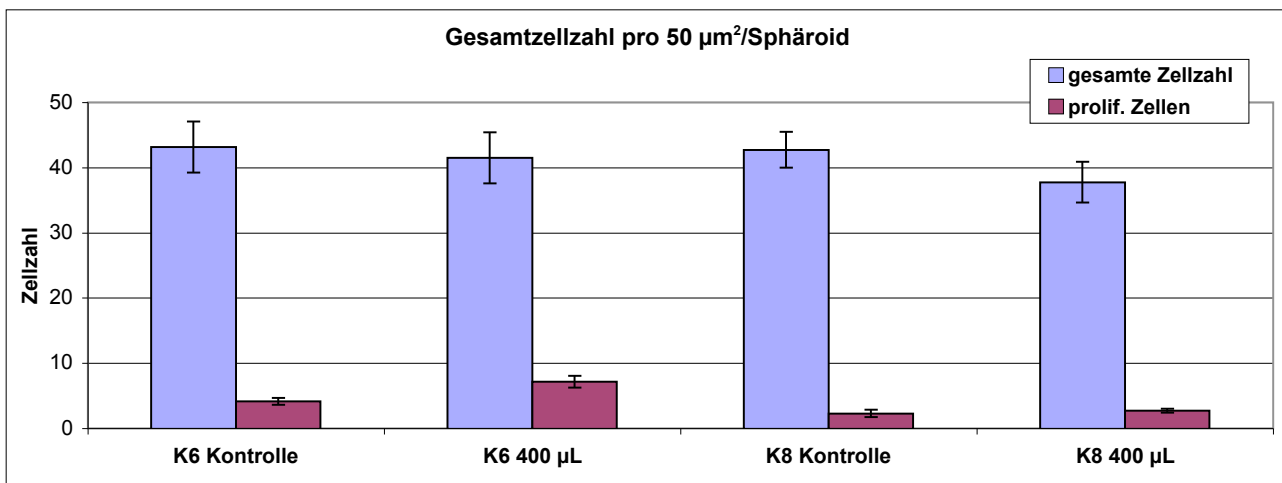


Abbildung 29: Anzahl der proliferierenden Zellen in Kontrollen und behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtag 6 und 8. In Kontrollen und mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Kulturen. Gesamtzellzahl (DAPI) in einer Fläche von $50\ \mu\text{m}^2$: hellblau. Menge der proliferierenden Zellen in der gleichen Fläche: lila.

4.2.3. Apoptose

Der programmierte Zelltod oder die Apoptose wurde mittels der TUNEL- Methode nachgewiesen (s.3.2.6).

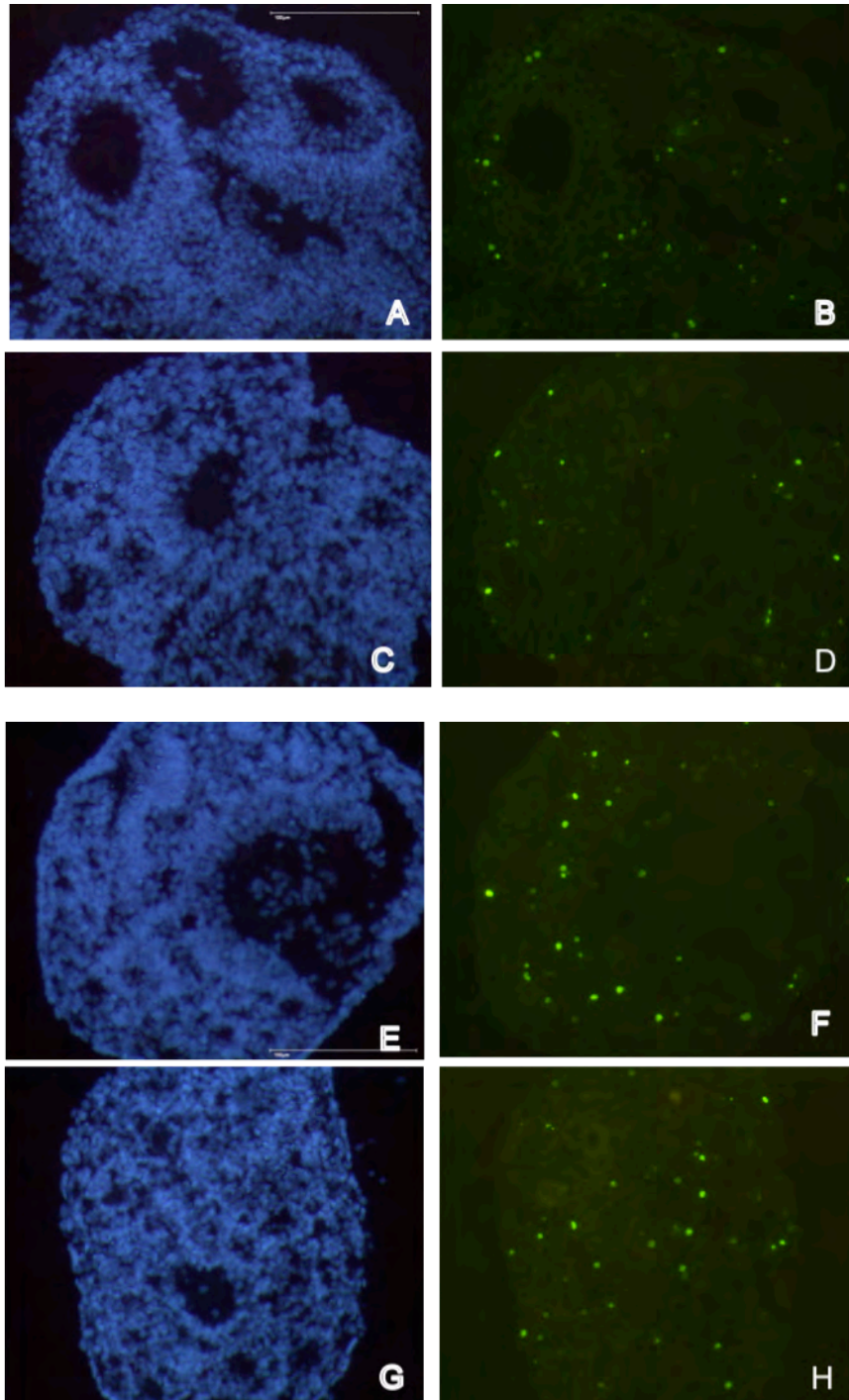


Abbildung 30: Apoptose ist in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden unverändert. A,B: K6, Kontrolle. C,D: 0,4 mM Glutaminsäure E,F: K8, Kontrolle. G,H: 0,4 mM Glutaminsäure.

Die Anzahl der apoptotischen Zellen in den behandelten Rosettensphäroiden war im Vergleich zu den nicht behandelten Proben unverändert.

4.2.4 Verringerung der cholinergen Amakrinzellen in der INL durch Glutamatbehandlung

4.2.4.1 ChAT-Expression wird durch Glutamat stark reduziert

Basierend auf der Arbeit von Reese et al. (2001), in der gezeigt wurde, dass mit L-Glutamat die cholinergen Amakrinzellen aus der Frettschenretina entfernt werden konnten, soll hier in den Rosettensphäroiden die Wirkung des Glutamats auf diese spezifische Amakrinzellpopulation dargestellt werden. Als spezifischer Marker für die cholinergen Amakrinzellen der embryonalen Hühnerretina eignet sich hierfür ein Antikörper gegen die Cholinacetyltransferase (ChAT). Cholinerge Neurone benutzen Acetylcholin als Neurotransmitter und benötigen somit die Cholinacetyltransferase für dessen Synthese.

Die Somata cholinergischer Amakrinzellen sind sowohl am unteren Rand der INL als auch in der Ganglienzellschicht als sog. ‚displaced amacrine cells‘ zu finden (Typ I und Typ II). Diese ordnen sich in charakteristischer Weise in einer fast spiegelbildlichen Symmetrie in einer Ebene um die IPL in der Retina an. Ihre Fortsätze bilden in der IPL zwei Subbanden (s.1.3.1 Amakrinzellen). Diese spezifischen cholinergen Subbanden in der IPL galt es im *in-vitro* Rosettensphäroidensystem vor und nach der Glutamatbehandlung darzustellen und zu vergleichen. Zusätzlich war auch interessant, ob sich die Mosaik-ähnliche Anordnung der Typ I und Typ II Zellen der *in-vivo* Retina auch im Rosettensphäroidensystem beobachten lässt.

Im Rosettensphäroid sind am vierten Kulturtag (K4) einige ChAT markierte cholinerge Amakrinzellen um die noch kleinen IPL-Bereiche am Rand der INL zu erkennen. Sie besitzen noch keine erkennbaren Fortsätze. Auch die in den IPL-Bereichen liegenden Zellen sind ChAT-positiv (Abb. 31). Zwei Tage später (K6) besitzen diese ChAT-positiven Zellen deutliche Fortsätze, die in die in IPL einwachsen und dort seitliche Fortsätze im Raum zwischen dem INL-Rand und den inneren Zellen der IPL ausbilden (Abb. 31). Am achten Kulturtag (K8) sind die ChAT-positiven Zellen am INL-Rand sehr regelmäßig angeordnet. Ihre Fortsätze bilden in der IPL eine charakteristische Subbande zwischen den Zentralzellen der IPL und dem inneren INL-Rand.

In einer Doppelfärbung mit ChAT und 3D10 für AChE wurde das gleichmäßige Verteilungsmuster der ChAT-positiven Zellen der INL verdeutlicht (Abb. 31). An Kulturtag acht zeigen sich in der Kontrolle am proximalen Rand der INL abwechselnd ChAT-positive und AChE-positive Amakrinzellen in einem regelmäßigen Muster. Sie bilden mit den wenigen ChAT-positiven Zellen im inneren der IPL ein dem Mosaikmuster der *in vivo* Retina ähnliches Bild

(Abb.5, Stanke et al. 2008). Somit handelt es sich bei den wenigen ChAT-positiven zentralen IPL-Zellen um die sogenannten ‚displaced amacrine cells‘ (Amakrinzelltyp Typ II).

Bei dieser AChE-Antikörperfärbung fällt wieder die frühe flächige Anfärbung des IPL-Bereichs auf. Diese Markierung ist vor dem Auswachsen der Fortsätze der ChAT-positiven Fortsätze vorhanden und verdichtet sich am Kulturtag acht zu einer Bande auf der Höhe der ChAT-positiven Subbande.

Nach der Glutamatbehandlung war die regelmäßige Anordnung der ChAT-positiven Zellen beginnend mit Kulturtag vier gestört und in ihrer Anzahl deutlich verringert. Die charakteristischen Fortsätze dieser Zellen, sowie deren Verzweigungen in der IPL an Kulturtag sechs sind nur ansatzweise zu beobachten. Dadurch bleibt am achten Kulturtag die Subbandenbildung in der IPL aus. Es sind nur noch wenige ChAT-positive Amakrinzellen am Rand der INL zu finden. Die regelmäßige Anordnung der cholinergen Amakrinzellen und das daraus resultierende charakteristische Verteilungsmuster fehlen vollständig, da die inneren ChAT-positiven Zellen in der IPL nicht mehr vorhanden sind (Abb. 31).

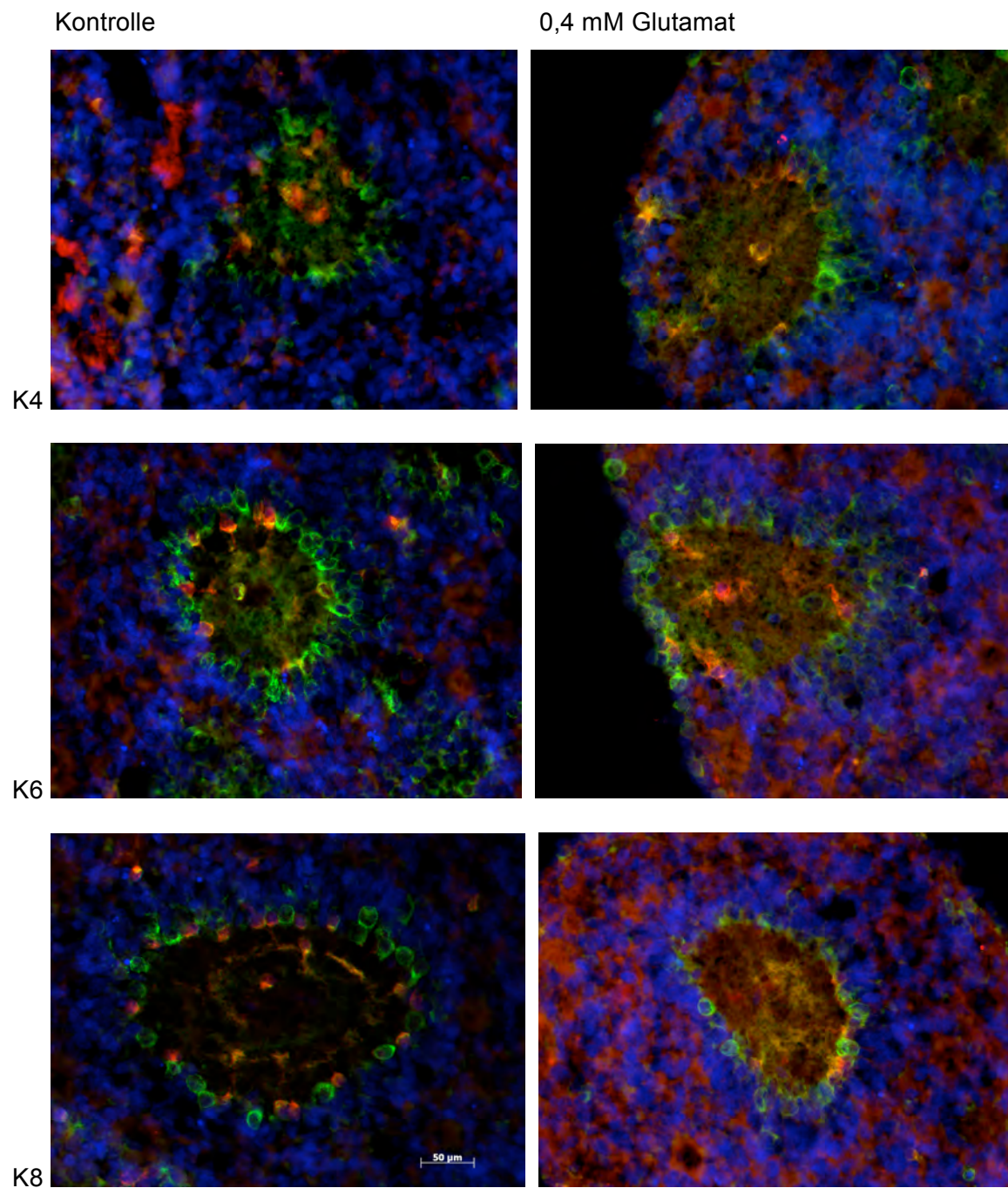


Abbildung 31: Entstehung der Subbanden in der IPL durch die Fortsätze von ChAT und 3D10-positiven Amakrinzellen von Kulturtag 4 bis 8. (Kontrollen: links. 0,4 mM Glutamat: rechts). In den Glutamat-behandelten Sphäroiden (rechts), Fehlen der Stratifizierung in der IPL, der ChAT-positiven Zellen und Reduktion der 3D10-positiven Zellen. DAPI (blau), ChAT (rot), 3D10 (grün). Maßstab: 50 µm.

4.2.4.2 Die mRNA-Expression der Cholinacetyltransferase der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide ist reduziert.

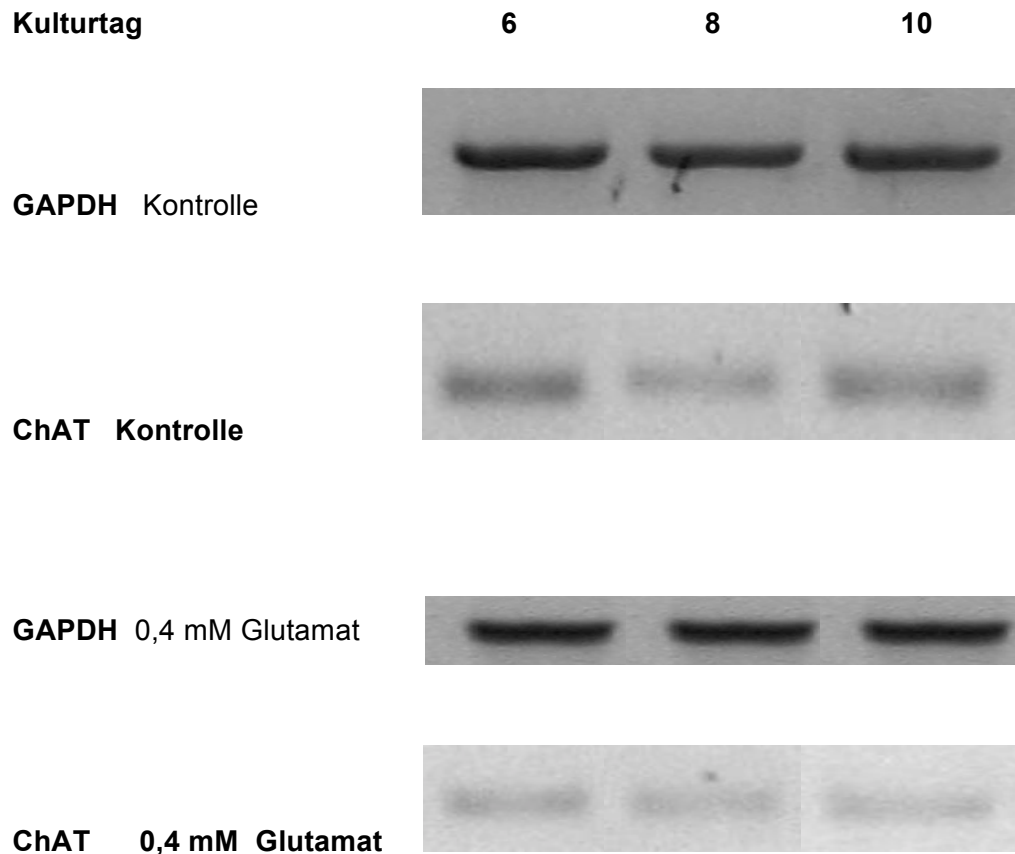


Abbildung 32: Temporale mRNA-Expression von ChAT an den Kulturtagen 6, 8 und 10 von Kontrollen und Glutamat-behandelten Proben.

Bei der PCR der Cholintransferase zeigt sich von Kulturtag 6 bis 10 eine gleichmäßige Reduktion des Signals in den behandelten Proben. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit der ChAT-Antikörperfärbung (s. Punkt 4.2.4).

4.2.4.3 Die AChE-positive Amakrinzellpopulation ist in behandelten Sphäroiden verringert

Um die Auswirkungen der Glutamatbehandlung auf die AChE-Expression im Sphäroids-system zu überprüfen wurde eine Antikörperfärbung gegen Acetylcholinesterase (AChE) durchgeführt. Histologisch lässt sich die AChE an Gefrierschnitten mit dem monoklonalen Antikörper 3D10 nachweisen.

Dadurch werden die AChE exprimierenden Zellen der INL markiert und es kann eine Aussage über den Differenzierungsgrad der behandelten Rosettensphäroide gemacht werden. Von Interesse war auch die Charakterisierung weiterer Amakrinzelltypen in der INL. Dies geschah hier mit dem Antikörper gegen Calretinin (s. Abschnitt 4.2.1) der in der Retina des Huhns eine Subpopulation von Amakrinzellen mit ihren Fortsätzen markiert, sowie deren Stratifizierung in der IPL charakterisiert. Ein kleiner Teil der AChE-positiven Zellen sind auch Calretinin positiv (siehe Pfeil, Abb. 33 E). Dies sind die sogenannten ‚starburst amacrine cells‘.

Die Intensität und Zellspezifität dieser Antikörperfärbungen ist an Kulturtag 6 und 8 besonders hoch, durch den großen IPL-Anteil im Sphäroid. Die AChE-positiven Zellen ordnen sich in charakteristischer Weise um die großen runden IPL-Bereiche am inneren Rand der INL-Bereiche an (Abb. 33 B). Sie bilden einen fast durchgehenden Ring um die IPL und projizieren in die IPL Bereiche und bilden dort eine meist flächige Fortsatzausdehnung im Gegensatz zu den langen, spezifischen Calretinin-positiven Fortsätzen (Abb. 33 G).

In den mit Glutaminsäure behandelten Sphäroiden ist die AChE-Expression deutlich reduziert. Es sind an den noch verbliebenen IPL-Bereichen weniger AChE-positive Zellen vorhanden. Die regelmäßige Verteilung dieser AChE exprimierenden Zellen in der INL der Kontrollen, ist bei den behandelten Sphäroiden aufgelöst. Die flächige Ausbreitung der AChE-positiven Fortsätze in der IPL ist in den mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroiden weniger sichtbar (Abb. 33 F,G). Auch die Überlappung von AChE-positiven Amakrinzellen mit Calretinin-positiven Amakrinzellen, (‚starburst amacrine cells‘) ist kaum mehr zu beobachten (Abb. 33 G). Insgesamt ist durch die Reduktion der INL und der IPL-Bereiche nach Glutaminsäurebehandlung eine deutliche Verringerung der AChE-positiven Amakrinzellpopulation festzustellen.

Zusammenfassend kann man nach der ChAT- und der AChE/Calretinin-Antikörperfärbung sehen, dass durch die Glutamat-Behandlung (bei den hier verwendeten Konzentrationen) im Rosettensphäroids-system die cholinerge Amakrinzellpopulation drastisch reduziert aber nicht vollständig entfernt wird. Es zeigt sich jedoch schon hier, dass durch Glutamat in den Rosettensphäroiden nicht nur spezifisch die cholinerge Amakrinzellpopulation ‚ausgenockt‘ wird, sondern auch die gesamte INL-Zellmenge (einschließlich der anderen Amakrinzellklassen) mengenmäßig deutlich reduziert wird (s. 4.2.6).

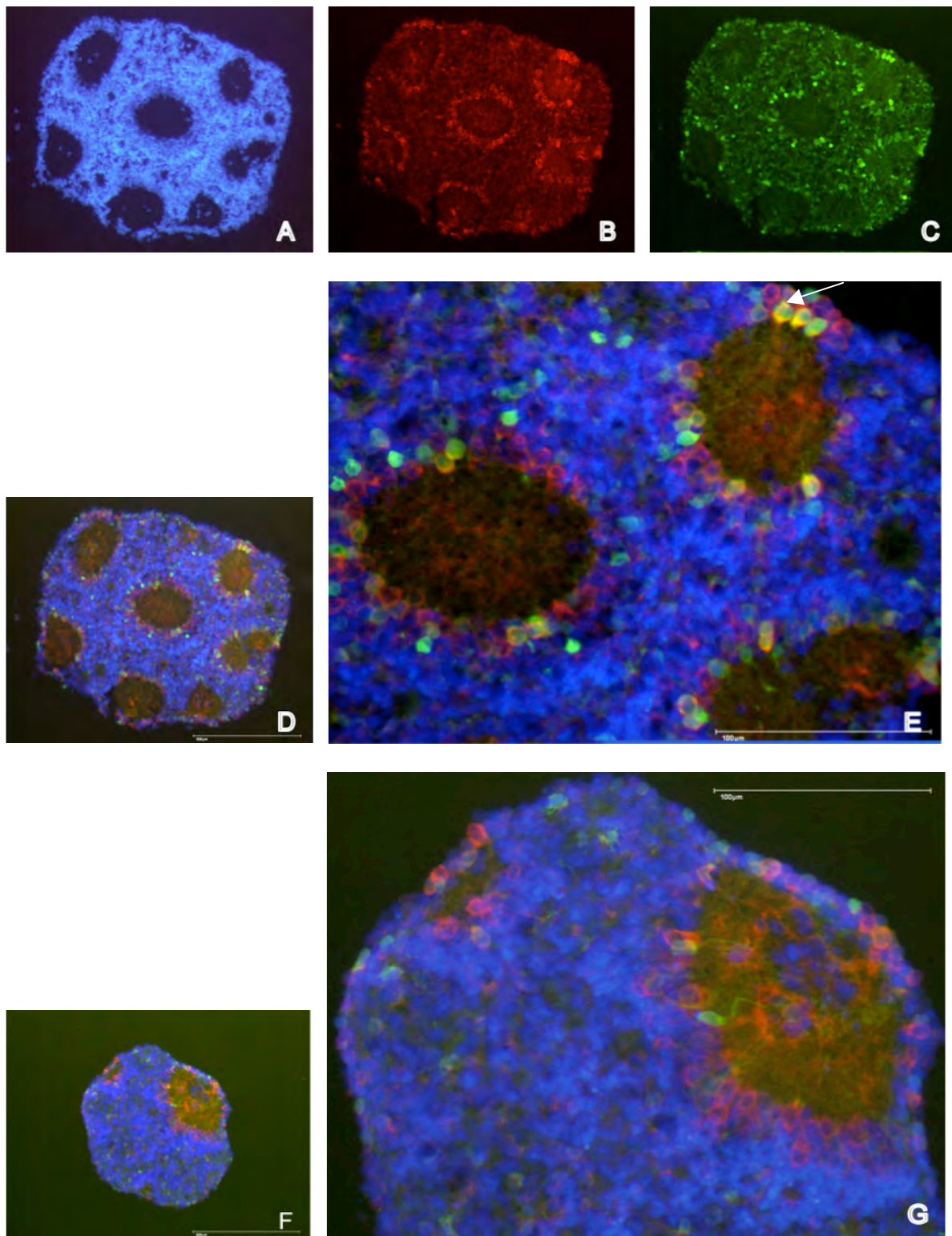


Abbildung 33: Reduktion der Calretinin und 3D10 (AChE)-positiven Amakrinzellen unter Glutamatbehandlung an Kulturtag 8. Kontrolle: A-E . 0,4 mM Glutaminsäure F-G: DAPI (blau) 3D10 (rot), Calretinin (grün). Pfeil (E): AChE und Calretinin-positive Amakrinzellen am Rand der INL.

Maßstab D,F: 200 µm, E,G: 50 µm.

4.2.5. Histochemischer Nachweis der Acetylcholinesterase mit der Methode nach Karnovsky/Roots (1964)

Eine weitere Charakterisierung der cholinergen Amakrinzellen der INL, kann über den Nachweis der Acetylcholinesterase (AChE) - Aktivität erfolgen. Dies geschieht mit Hilfe der Methode nach Karnovsky und Roots (siehe 3.2.7).

Des Weiteren spielt die Cholinesterase eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, die sich von ihrer bekannten Funktion im adulten Tier unterscheidet. Während einer zeitlich begrenzten Phase in der Entwicklung, ist die Cholinesterase-Aktivität in sich differenzierenden Zellen hoch. Sie wird dann auch als ‚embryonale Cholinesterase‘ bezeichnet (Drews 1975). Untergliedert man die Cholinesterase in Butyrylcholinesterase und Acetylcholinesterase kann die Proliferationsphase mit der Butyrylcholinesterase und die Differenzierungsphase mit der Acetylcholinesterase gekoppelt werden (Layer et al. 1987). Somit kann hier dieser AChE-Nachweis auch zum Vergleich von Differenzierungsvorgängen in behandelten und unbehandelten Rosettensphäroidkulturen benutzt werden.

Beginnend mit Kulturtag 2 ist bei der Karnovsky-Roots Reaktion ein Unterschied zwischen den behandelten Rosettensphäroiden und den Kontrollsphäroiden zu sehen (Abb. 34). Die mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Sphäroide zeigen nach zwei Tagen in Kultur an ihrem Rand weniger kupferrotbraune Zellen, in denen Enzymaktivität stattgefunden hat als die Kontrollen.

An Kulturtag vier sind in den Kontrollen alle sich bildenden IPL/INL-Regionen gleichmäßig flächig braun markiert. Hier ist eine hohe AChE-Aktivität zu beobachten. In den behandelten Proben setzt sich die Reduktion der AChE-positiven Zellen fort, die Enzymaktivität ist verringert. Es sind deutlich weniger zukünftige IPL-Bereiche angefärbt. Einzelne INL-Bereiche sind nur noch durch wenige braune Zellen gekennzeichnet.

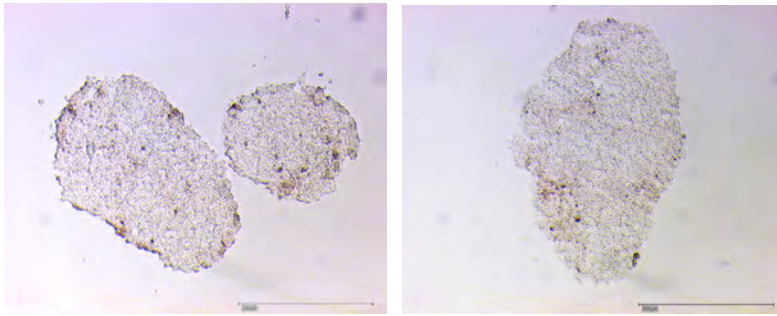
Zwei Tage später, am sechsten Kulturtag bilden sich in der INL der Kontrollen definierte AChE-positive Zellringe um die IPL-Bereiche. In den IPL-Bereichen bilden sich ringartige Banden. Dies fehlt in den behandelten Sphäroiden vollständig. Neben einer deutlichen Reduktion der AChE-Aktivität im ganzen Rosettensphäroid sind auch weniger spezifische Amakrinzellen in der INL positiv (Abb. 34).

Am achten Kulturtag ist in den unbehandelten Rosettensphäroiden der histochemische Nachweis der AChE am spezifischsten. Eine Reihe regelmäßig angeordneter Amakrinzellen in der INL zeigt eine hohe AChE-Aktivität. In den IPL-Bereichen ist eine AChE-positive, runde Subbande entstanden, die durch die Fortsätze der Amakrinzellen mit hoher AChE-Reaktion stammt.

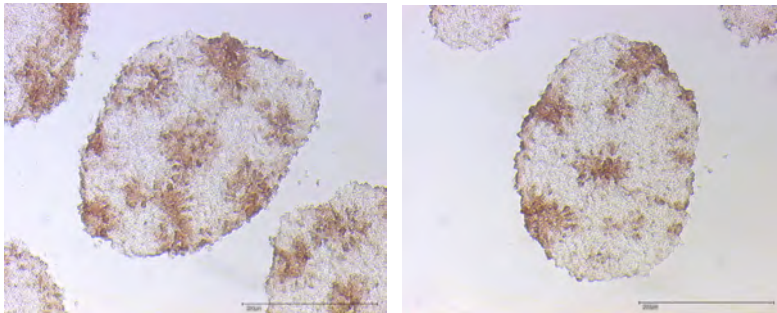
In den behandelten Sphäroiden ist die charakteristische IPL/INL-Markierung durch diesen Nachweis fehlend. Es ist teilweise nur noch einzelner, reduzierter IPL-Bereiche im Inneren des Sphäroids mit angrenzenden positiven Amakrinzellen zu sehen (Abb. 34, 35). Die Abnahme der AChE-Aktivität durch die Glutamatbehandlung ist zwischen Kulturtag sechs und acht am stärksten.

Die Enzymaktivität ist in der normalen Rosettensphäroidentwicklung am zehnten Kulturtag geringer als zwei Tage zuvor. Die Markierung der Amakrinzellen ist deutlich schwächer, wobei die IPL-Bereiche noch dunkelbraun markiert sind. In den 0,4 mM behandelten Proben sind keine INL-Zellen oder IPL-Bereiche mehr durch die Karnovsky/Roots-Reaktion markiert. Es kann keine AChE-Aktivität mehr nachgewiesen werden (Abb. 34 unten).

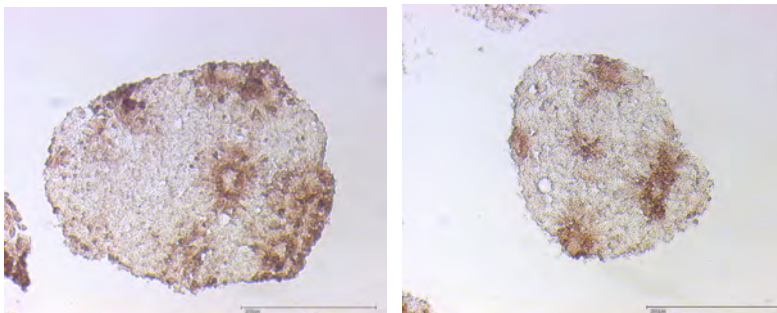
K2



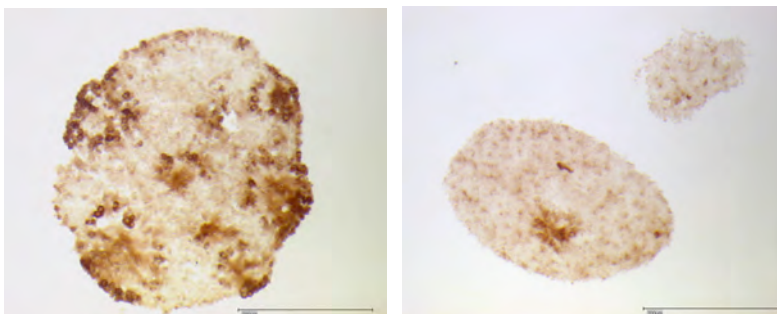
K4



K6



K8



K10

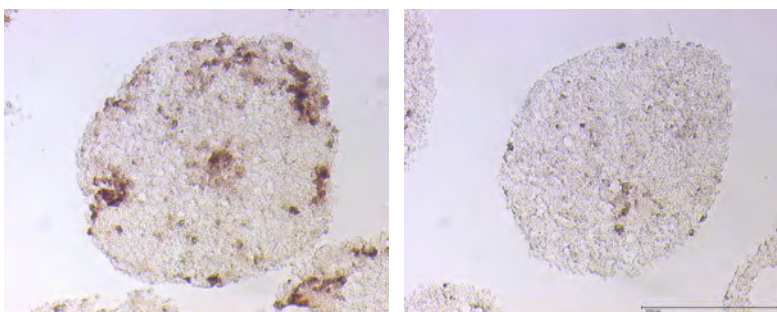


Abbildung 34 : Reduktion der AChE-Aktivität in Glutamat-behandelten Rosetten-sphäroiden. Nachweis der AChE-Aktivität an Kulturtag 2, 4, 6, 8, 10 (von oben nach unten) mit der Karnovsky/Roots-Methode in Kontrollen und behandelten Sphäroiden. Jeweils Kontrolle (links) und 0,4 mM Glutaminsäure (rechts). Maßstab: 200 µm.

K8 Kontrolle

0,2 mM Glutamat

0,4 mM Glutamat

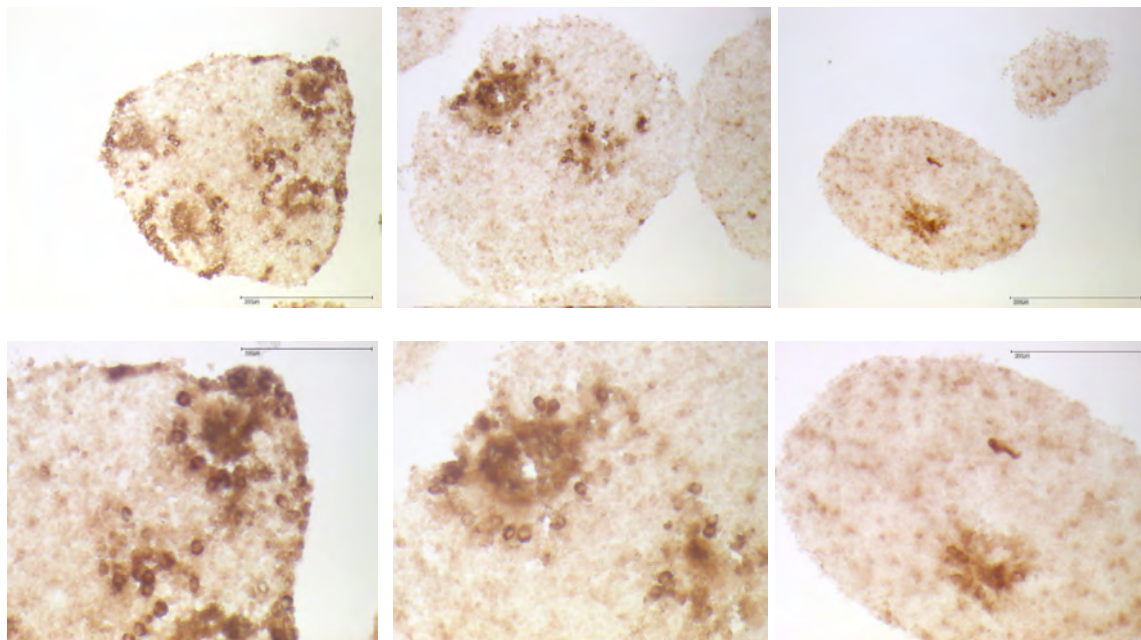


Abbildung 35: Nachweis der AChE- Aktivität an Kulturtag 8 in Kontrollen, 0,2 mM und 0,4 mM Glutamat-behandelten Sphäroiden. Kontrolle (links), 0, 2 mM Glutaminsäure (Mitte), 0,4 mM Glutaminsäure (rechts). Oben: Maßstab 200 µm. Unten : Vergrößerung der oberen Bildreihe. Maßstab: 100 µm .

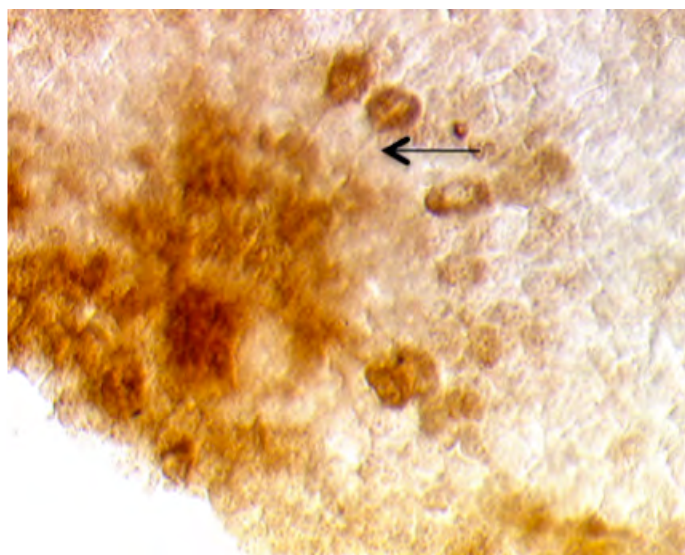


Abbildung 36: AChE- positive Projektionen in die INL. Vergrößerter Ausschnitt eines IPL-Bereichs und AChE-positiven INL-Zellen mit Projektionen (Pfeil) in die IPL.

4.2.5.1 Die AChE-Aktivität in Glutamat-behandelten Rosettensphäroidkulturen ist geringer

Ellman-Assay

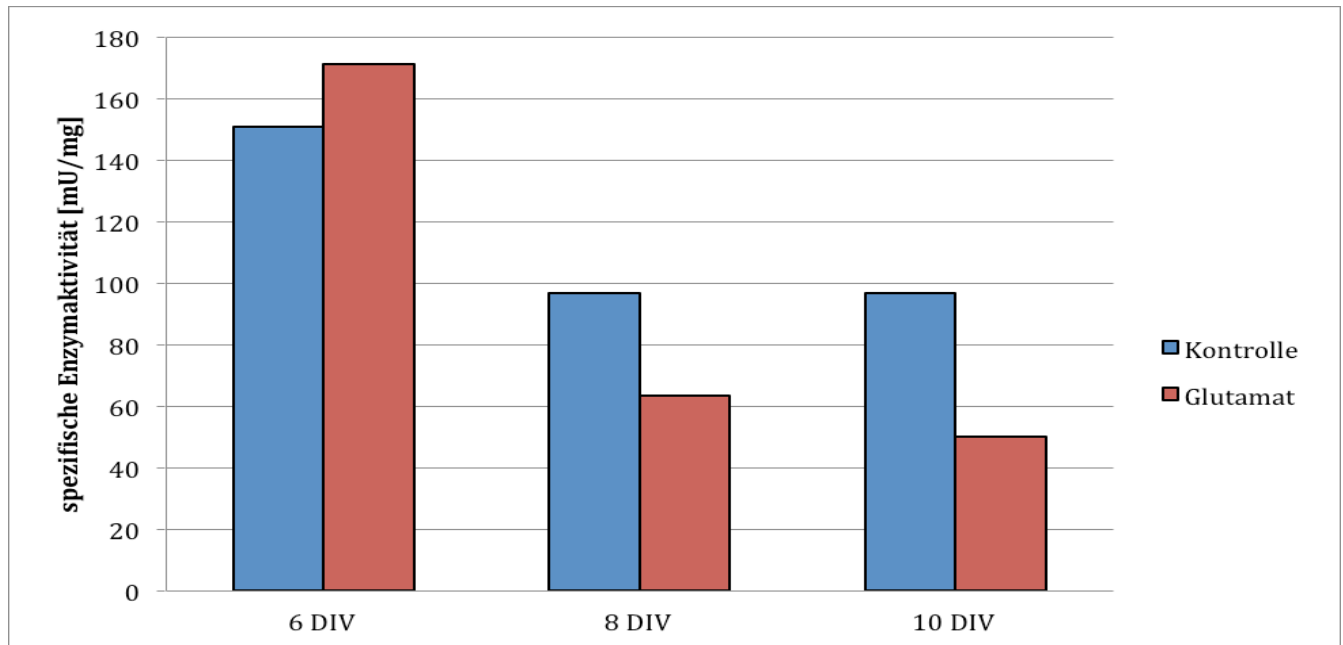


Abbildung 37: AChE-Aktivität an Kulturtag 6, 8, 10 in Glutamat-behandelten Proben und Kontrollen. Kontrolle blaue Balken, behandelte Rosettensphäroide rote Balken.

4.2.5.2 Die mRNA-Expression der AChE der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide ist reduziert.

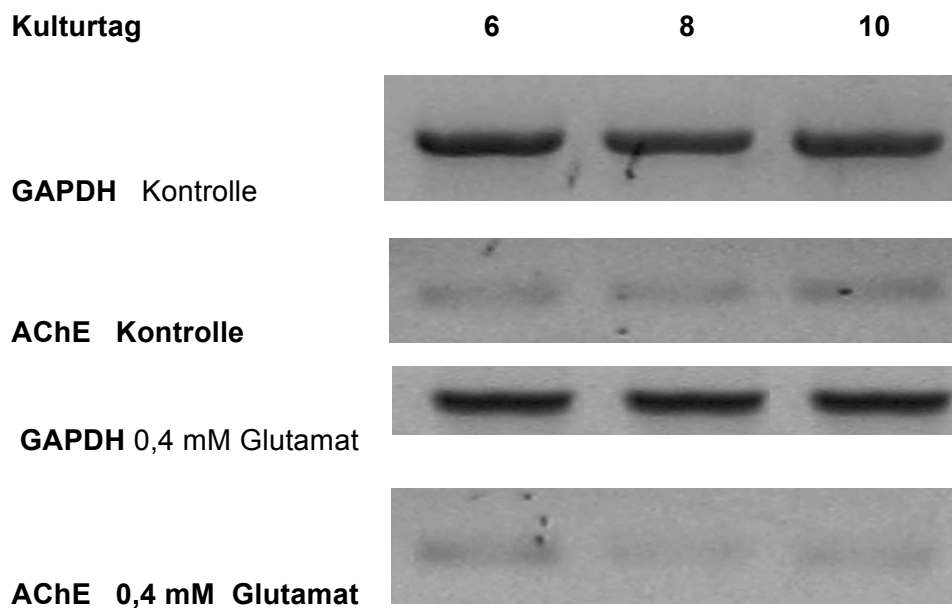


Abbildung 38: Temporale mRNA-Expression von AChE an den Kulturtagen 6, 8 und 10 von Kontrollen und Glutamat-behandelten Proben.

Die deutlich reduzierte AChE-Aktivität in den Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden, gezeigt mit der Karnovsky-Roots-Reaktion und der 3D10 Antikörperfärbung (s. Punkt 4.2.5) war Grundlage für die Überprüfung dieses Resultats auf mRNA-Ebene.

Die PCR der Acetylcholinesterase, zeigt eine deutliche Reduzierung der mRNA der Glutamat-behandelten Proben. Bei der AChE ist an Kulturtag 6 der 0,4 mM behandelten Rosettensphäroide, die Bande im Agarosegel ähnlich der Kontrollbande. Die AChE ist hier kaum reduziert. An Kulturtag 8 und 10 ist jedoch die AChE-Bande im Vergleich zu den Kontrollbanden kaum mehr sichtbar. Hier bestätigt sich die in den Antikörperfärbungen (Punkt 4.2.4.3) beobachtete deutliche Reduzierung der AChE.

4.2.6 Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden führt zu reduzierten IPL und INL-Bereichen.

Ausgehend von den deutlichen morphologischen Veränderungen der IPL-Bereiche der Rosettensphäroide nach der Glutamatbehandlung, wurden die angrenzenden Zellen der inneren nukleären Schicht (INL) und die in den IPL-Bereichen liegenden Zellen histologisch untersucht. Dies geschah mit Hilfe von Antikörpereinzelfärbungen und Doppelfärbungen.

Da die Fortsätze der INL-Zellen in der IPL verschaltet werden und dort Subbanden bilden, ist von Interesse, wie die unterschiedlichen INL-Zelltypen auf die Glutamatbehandlung reagieren. Das heißt, wie unterscheidet sich der INL-Aufbau und das charakteristische Mengenverhältnis der verschiedenen INL-Zelltypen, der behandelten Rosettensphäroide von den Kontrollen.

Von großer Bedeutung sind auch die in den IPL-Bereichen liegenden Zentralzellen. Wie reagieren sie auf die Glutamatbehandlung und können sie durch Antikörperfärbungen charakterisiert werden.

4.2.6.1 Darstellung der Amakrinzellen der INL und der inneren Zellen der IPL mittels Pax-6, Calretinin und Islet-1

Pax-6

Die Amakrinzellen stellen den größten Anteil der INL-Zellen im Rosettensphäroid dar. Da sie in viele verschiedene Subtypen unterteilt sind, können sie auch durch verschiedene Antikörper markiert werden. Der Antikörper Pax-6 ('paired box') weist den Transkriptionsfaktor Pax-6 nach. Er ist primär ein charakteristischer Marker für den Großteil der Amakrinzellen in der INL und sekundär auch für die Ganglienzellen der GCL, in der Retina des Huhns.

Am sechsten Kulturtag charakterisieren die Pax-6 positiven Zellen die INL der Kontrollen. Sie sind in einer durchgehenden Schicht um die runden IPL-Bereiche angeordnet und umfassen meist zwei bis drei Zelllagen. Dadurch geben sie dem Sphäroidquerschnitt eine deutliche INL / IPL-Gliederung. In den intermediären Bereichen sind einige wenige Pax-6 positive Zellen zu erkennen (Abb. 39).

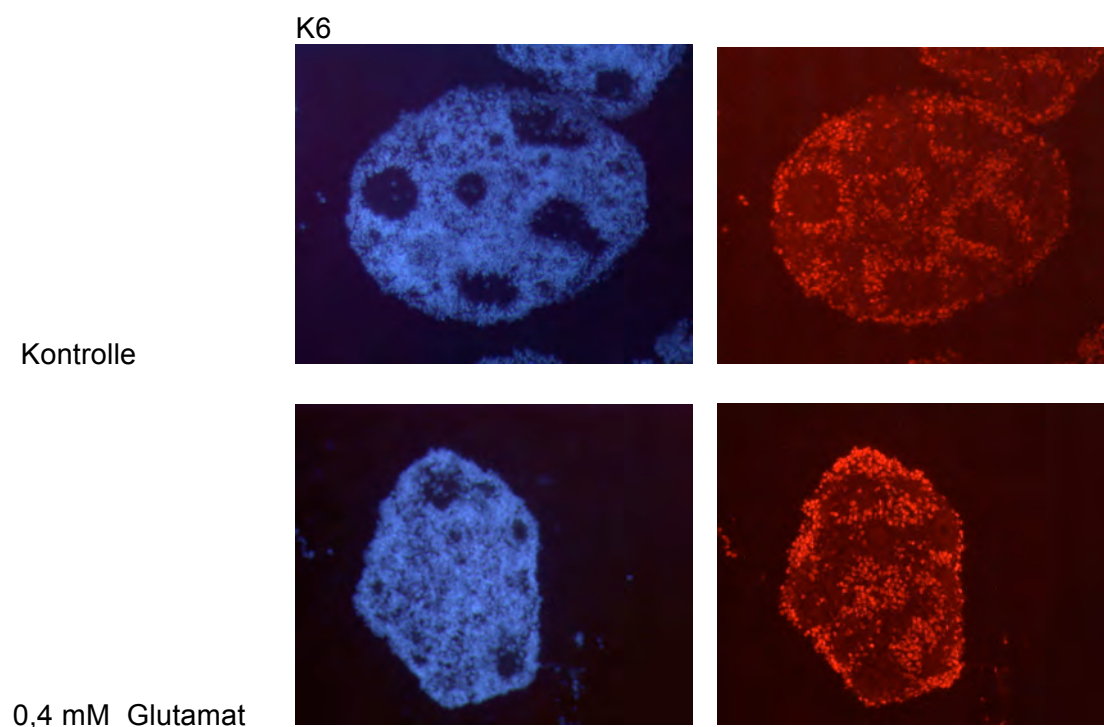
Die mit Glutaminsäure behandelten Sphäroide (0,4 mM) weisen dagegen keine durch die Pax-6-Färbung charakteristische INL / IPL-Gliederung im Querschnitt auf. Die Pax-6 exprimierenden Zellen zeigen reduzierte IPL-Bereiche auf, sind aber nicht einer zusammenhängenden Zellschicht zuzuordnen.

An Tag 8 fällt in den Kontrollen zusätzlich eine verstärkte Pax-6-Färbung an der Außenseite der beulenartigen IPL-Ausstülpungen (Abb.39) auf, sowie am Rand eine einschichtige, umlaufende, schwache Pax-6 positive Zellschicht (s. Abb.39, langer Pfeil). Zusätzlich ist zu erkennen, dass die in den runden IPL-Bereichen liegenden Zellen, auch leicht Pax-6 positiv sind (s. Abb. 39 kurzer Pfeil). Im Gewebe zwischen den IPL-Bereichen und den Rosetten sind kaum Pax positive Zellen vorhanden.

Die mit Glutamat behandelten Sphäroide an Kulturtag 8, zeigen keine runden Pax-6 markierten INL-Bereiche (Abb.40). Diese sind nur noch durch eine Anhäufung Pax-6 exprimierender Zellen angedeutet. Auch die stark Pax-6 exprimierende Außenzellschicht der IPL-Beulen fehlt. In den intermediären Bereichen sind jedoch einige leicht Pax-6 positive Zellen zu erkennen.

An Kulturtag 10 werden die INL-Bereiche der Kontrollen immer noch durch Pax-6 positive Ringstrukturen charakterisiert. Die behandelten Sphäroide zeigen nur wenige stärker exprimierende Pax-6 Zell-Anhäufungen als Andeutung eines IPL-Bereichs und wieder mehr leichter Pax-6 positive Zellen über den Sphäroidquerschnitt verteilt.

Abbildung 39: Legende S. 82



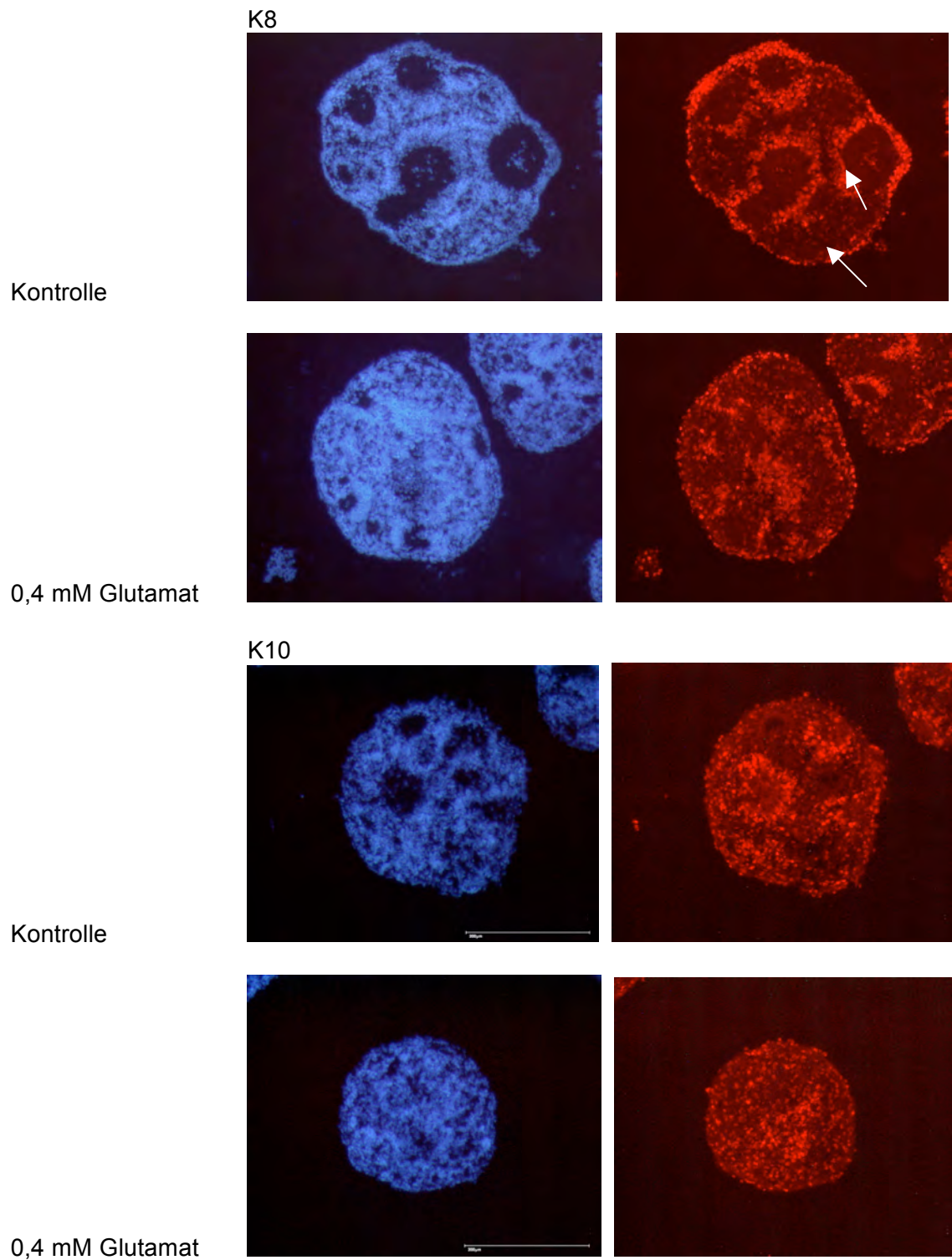


Abbildung 39: Entwicklung der Pax-6-Expression in Kontrollen und Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden an Kulturtag 6,8,10. Maßstab: 200 μ m.

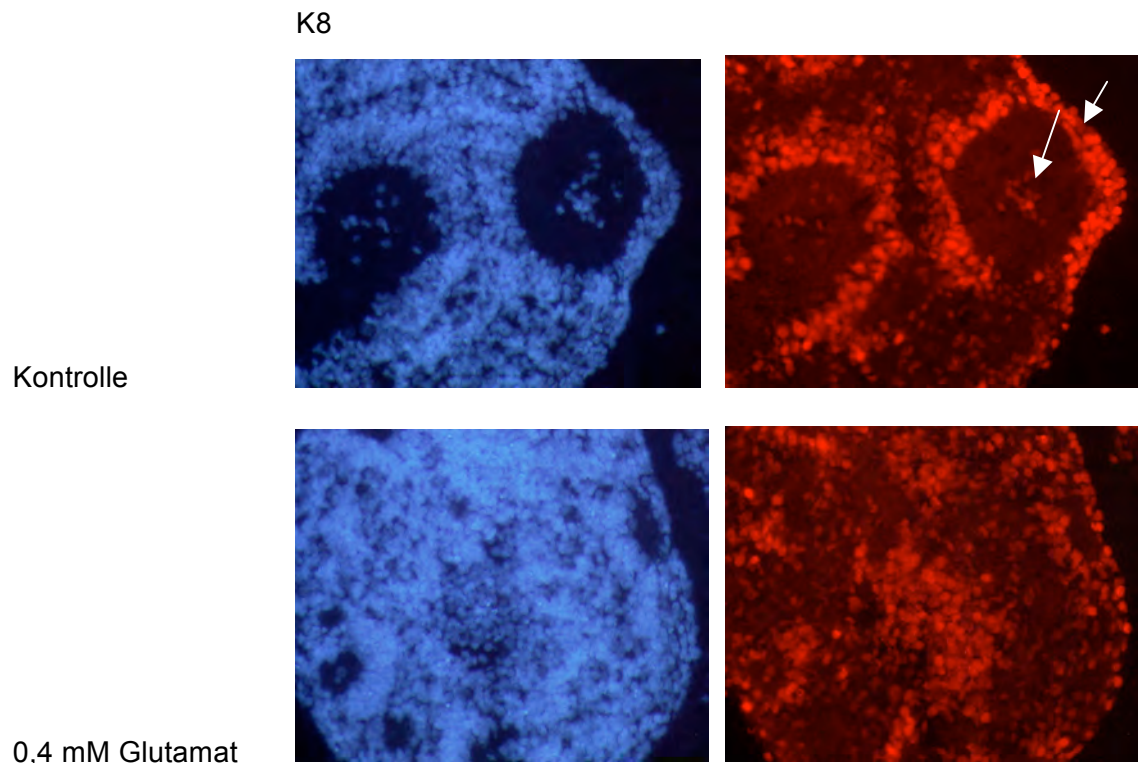


Abbildung 40: Pax-6-positive Zellen in der INL und der IPL sind in behandelten Sphäroiden reduziert und unorganisiert. Vergrößerte Ausschnitte (Abb.31) von K8. DAPI und Pax-6 an Kryostatschnitten. Langer Pfeil: innere IPL-Zellen, kurzer Pfeil: äußere INL-Zellen an der IPL-Beule.

Calretinin und Islet-1

Calretinin ein Calcium bindendes Protein, ist in der Retina des Huhns ein weiterer Marker für ein Großteil der Amakrinzellen (s. 4.1.2). Es wird von Amakrinzellen in der INL exprimiert, die sich morphologisch durch die Größe ihrer Zellkörper und durch ihre langen Fortsätze von anderen Amakrinzellen unterscheiden (s. Abb. 41). Die Fortsätze der Calretinin-positiven Zellen in der INL projizieren in die IPL in Richtung der dort zentral liegenden Zellen und bilden im Zwischenraum in der IPL sichtbare Subbanden. Es wird hier eine Subpopulation der cholinergen Amakrinzellen durch Calretinin charakterisiert. Außer in der INL gibt es auch viele kleine, leicht Calretinin-positive Zellen in den intermediären Bereichen zwischen den Rosetten und den INL-Bereichen. Die in den IPL-Bereichen liegenden Zellen sind nie Calretinin-positiv.

In einer Studie von 2001 (Reese et al. 2001) konnte an der Retina von Frettchen die Bedeutung der cholinergen Amakrinzellen für die IPL Entwicklung demonstriert werden. Durch eine Glutamatbehandlung wurde hier die Population der cholinergen Amakrinzellen entfernt. Dadurch konnte die Entstehung der cholinergen Stratifizierung der IPL, innerhalb der IPL-Entwicklung untersucht werden und die Auswirkung auf die Bildung anderer Stratifizierungen in der IPL.

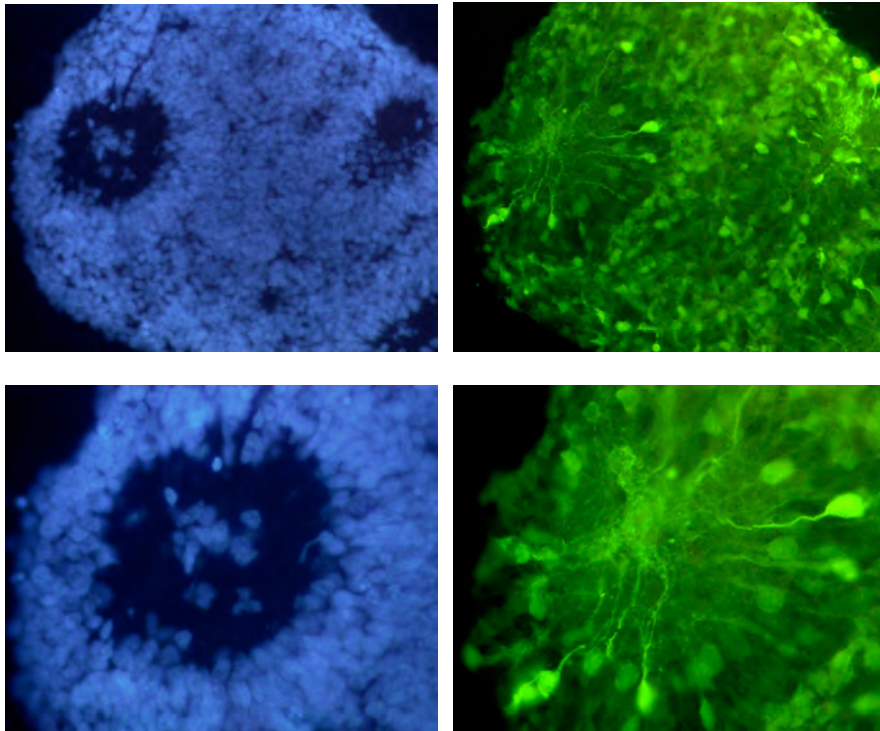


Abbildung 41: Calretinin-positive Zellen in der INL und deren Fortsätze

K6 Kontrolle DAPI / Calretinin (grün) Unten: Vergrößerte Ausschnitte der oberen Bilder

Mit anderen Amakrinzell-spezifischen Antikörpern, wie beispielsweise Islet-1, können weitere Amakrinzell-Subpopulationen in der INL unterschieden werden. Islet-1 ein ‚LIM-domain‘ Transkriptionsfaktor, der von Bipolarzellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen der Retina exprimiert wird (Fischer et al. 2002). In der sich entwickelnden Hühnerretina sind Amakrinzellen und Ganglienzellen Islet-1 immunreaktiv.

In Rosettensphäroiden werden neben den Amakrinzellen der INL auch die in den IPL-Bereichen liegenden Zellen markiert (s. Abb.34). Ganglienzellen sind in Rosettensphäroiden nur bis Kulturtag drei vorhanden, deshalb ist der Nachweis von Ganglienzellen im differenzierten Sphäroid ausgeschlossen. Die mit Islet-1 charakterisierten Amakrinzellen sind kleiner, als die mit Calretinin markierten Amakrinzellen und ohne Fortsätze. Sie sind nicht deckungsgleich mit den Calretinin-markierten INL-Zellen.

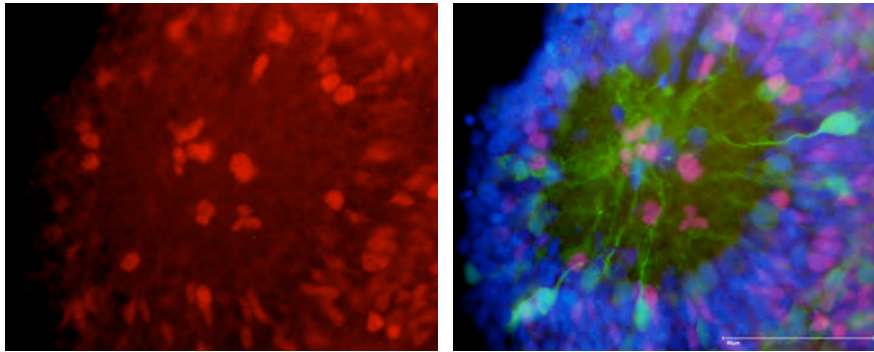


Abbildung 42: Markierung der inneren IPL-Zellen mit Islet-1. K6 Kontrolle
Doppelfärbung: Calretinin (grün), Islet-1 (rot). (Ausschnitt, siehe Abb.32). Maßstab. 50 µm.

Bei einer Doppelfärbung von Calretinin mit Pax-6 zeigt sich, dass die Calretinin-markierten Amakrinzellen auch Pax-6 positiv sind. Es sind aber weit mehr Zellen der INL Pax-6 positiv als Calretinin-positiv. Nicht deckungsgleich sind jedoch die inneren IPL-Zellen. Sie sind ausschließlich Pax-6 positiv (Abb. 43).

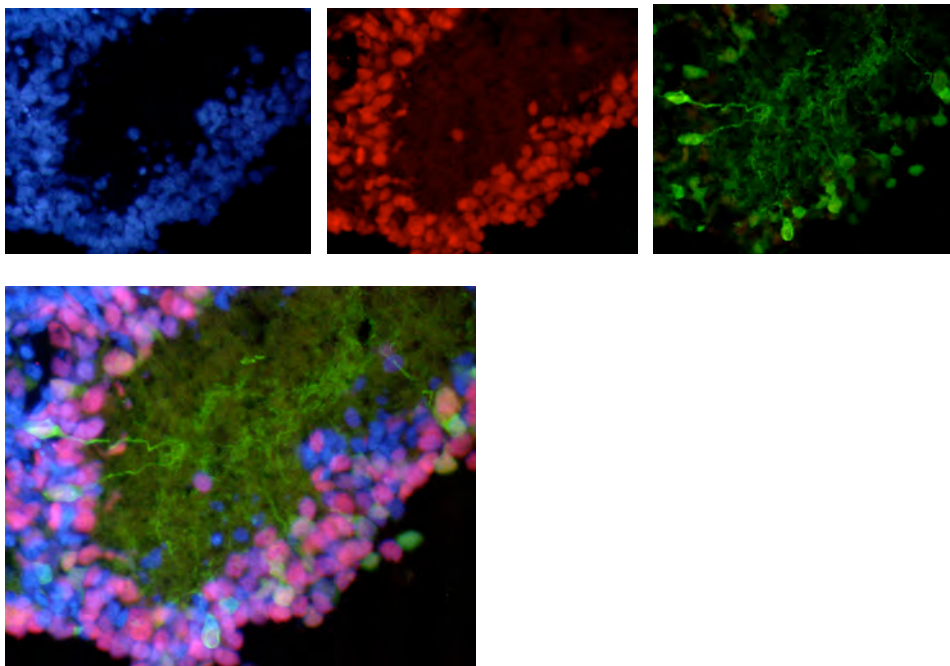


Abbildung 43: Calretinin markierte Zellen sind auch Pax-6 positiv. K6 Kontrolle
Doppelfärbung: Calretinin (grün), Pax-6 (rot).

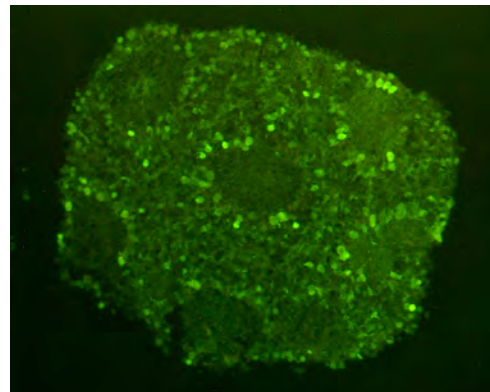
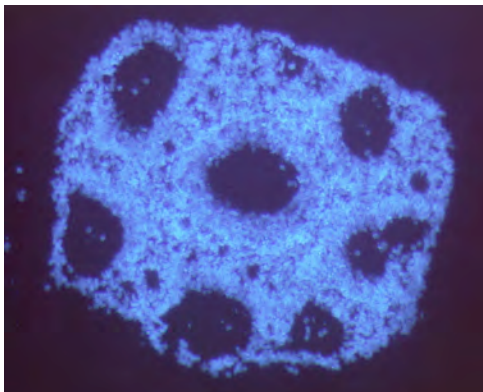
Die mit Glutamat behandelten Rosettensphäroide zeigen ab Kulturtag 6 eine Reduktion der Calretinin-positiven Amakrinzellen. Die restlichen Calretinin positiven INL-Zellen exprimieren jedoch meist schwächer Calretinin. Sie ordnen sich aufgrund des geringeren IPL- Anteil im Sphäroid nicht regelmäßig in der INL an. Die Fortsätze der Calretinin-positiven Amakrinzellen sind oft kurz oder fehlend (s. Abb.44, 45).

Am achten Kulturtag verstärkt sich der Glutamateffekt. In den mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroiden sind die Calretinin markierten Zellen der INL fast vollkommen verschwunden. Nur noch wenige stark Calretinin-positive Amakrinzellen sind am Rand der rudimentären IPL-Bereiche zu finden. Sie haben dann auch ihre charakteristischen langen Fortsätze in die IPL-Bereiche verloren. Die Subbandenbildung in der IPL ist parallel zur IPL-Reduktion stark reduziert oder fehlend. Eine regelmäßige Anordnung dieser Amakrinzellen in der INL ist nicht mehr vorhanden (Abb. 45).

Die Behandlung mit Glutaminsäure führt hier in den Rosettensphäroiden zur mengenmäßigen Reduktion der morphologisch größeren cholinergen Amakrinzellen. Durch die meist fehlenden Fortsätze dieser Zellen ist die Bildung von Subbanden in der IPL verringert oder nicht vorhanden. Die reduzierten IPL- Bereiche im Sphäroid führen zu einer unregelmäßigen Anordnung dieser Amakrinzellen in der reduzierten INL. Es sind nur noch wenige Calretinin-positive Zellen vorhanden, ein vollständiges Entfernen dieser Amakrinzellpopulation konnte jedoch mit einer 0,4 mM Glutaminsäurekonzentration im Rosettensphäroid nicht beobachtet werden (Abb.45).

K8

Kontrolle



0,4 mM

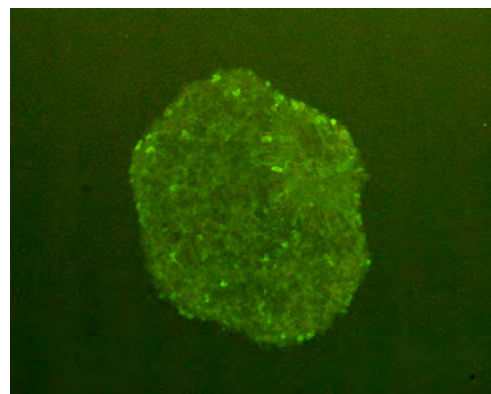
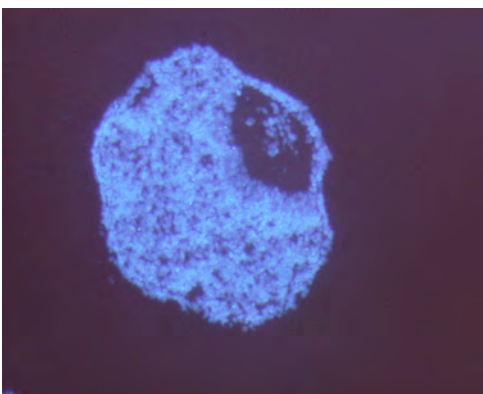


Abbildung 44: Reduktion der Calretinin-positiven Amakrinzellpopulation durch Glutamatbehandlung. K8: Kontrolle (oben) 0,4 mM Glutaminsäure (unten). DAPI (blau), Calretinin (grün).

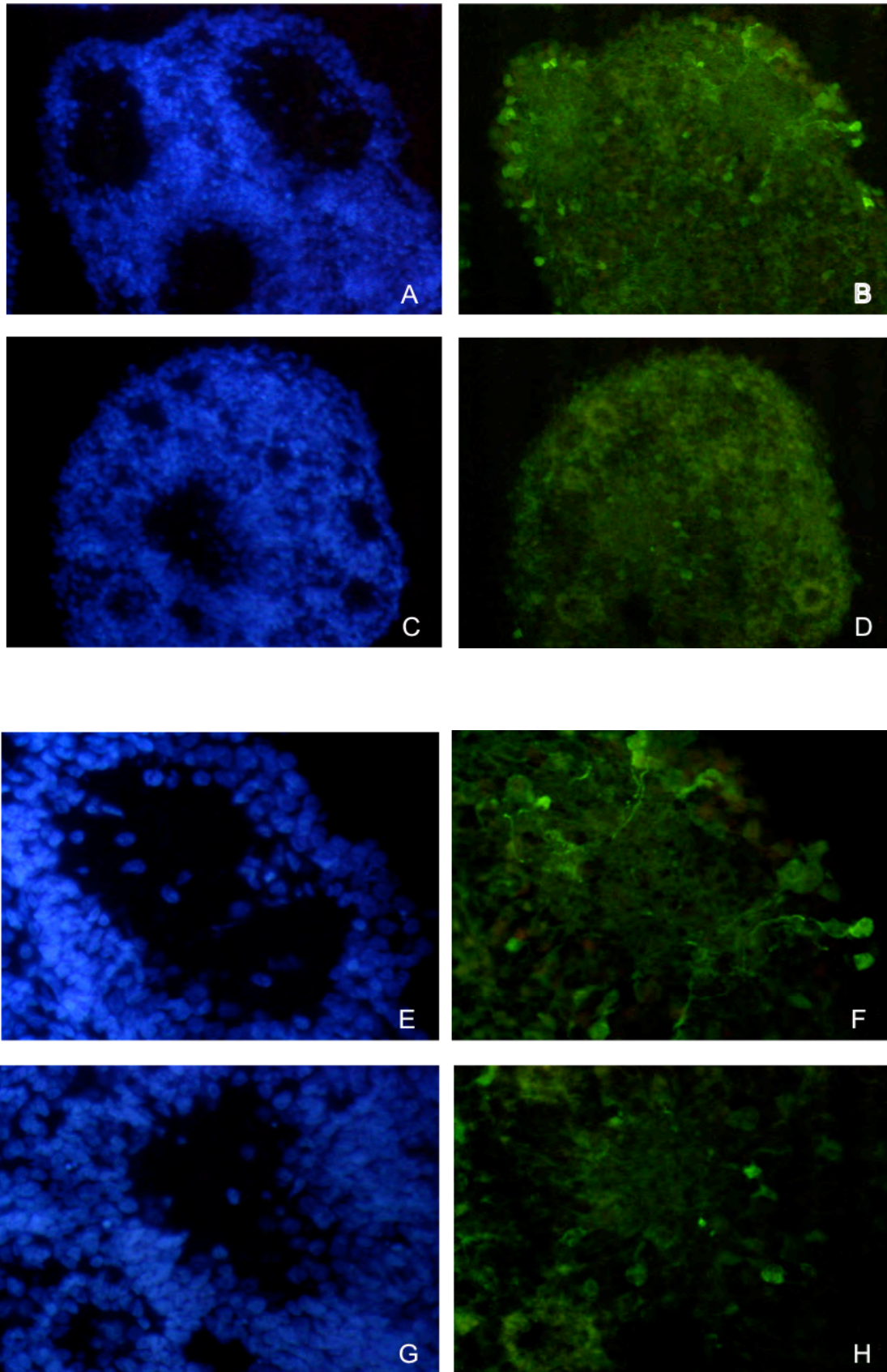


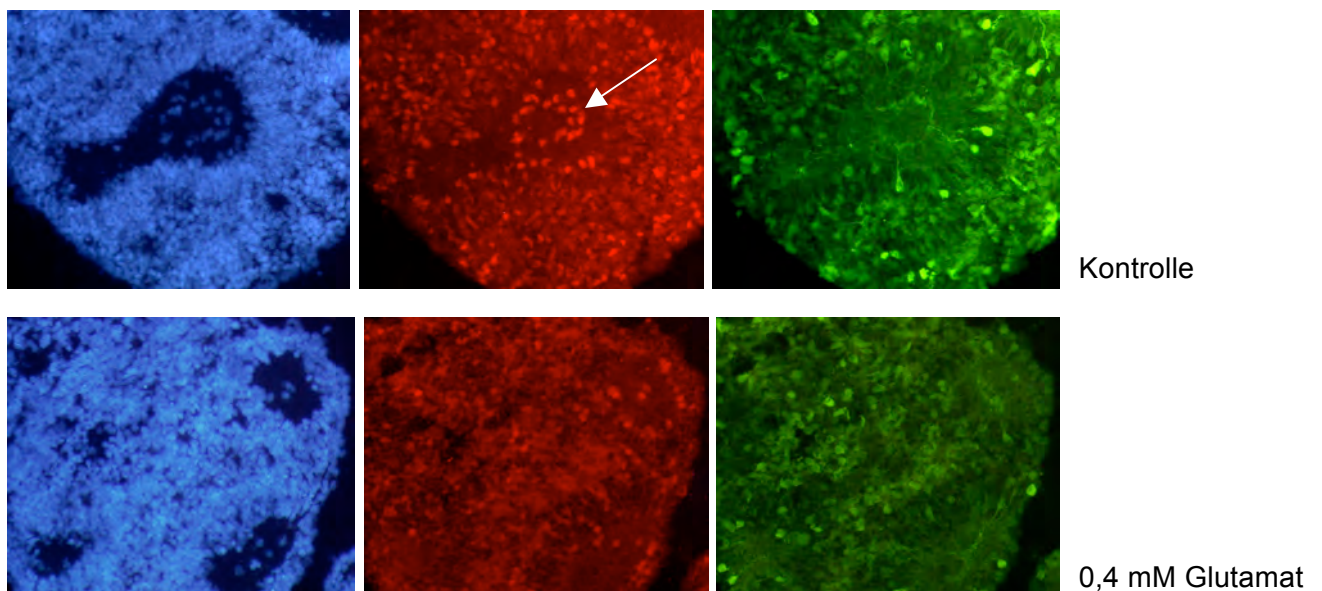
Abbildung 45: Calretinin-positive Zellen bilden unter Glutamatbehandlung kaum Fortsätze. IPL-Stratifizierung unterbleibt, DAPI (blau), Calretinin (grün). A,B: K6 Kontrolle (E,F: vergrößerter Ausschnitt). C,D: K6 0,4 mM Glutaminsäure (G,H: vergrößerter Ausschnitt).

Islet-1

Die Glutamatbehandlung der Rosettensphäroide zeigt auch Auswirkungen auf die Islet-1-positive Amakrinzellpopulation in der INL. Insgesamt sind weniger Zellen stark Islet-1 positiv, speziell um die IPL-Bereiche. Auch die in den IPL-Bereichen liegenden Zentralzellen sind in ihrer Anzahl reduziert und exprimieren schwächer Islet-1. Dennoch sind im Sphäroidquerschnitt einige schwach Islet-1 markierte Zellen zu erkennen (s. Abb. 46: dicker Pfeil). Im ausdifferenzierten Rosettensphäroid (Abb. 46 K13) charakterisieren die Islet-1 positiven Zellen den äußeren Zellring, angrenzend dem dünnen, umlaufenden IPL-Bereich. Dieser Zellring ist größtenteils auch Calretinin-positiv (s. Abb. 46 langer, dünner Pfeil). Bei den behandelten Sphäroiden fehlt dieser durchgehende Islet-1 positive Ring. Schwach Islet-1-positive Zellen sind ohne Zuordnung zu einer spezifischen Schicht, über den Sphäroidquerschnitt verteilt.

Abbildung 46: Legende S. 89

K6



K13

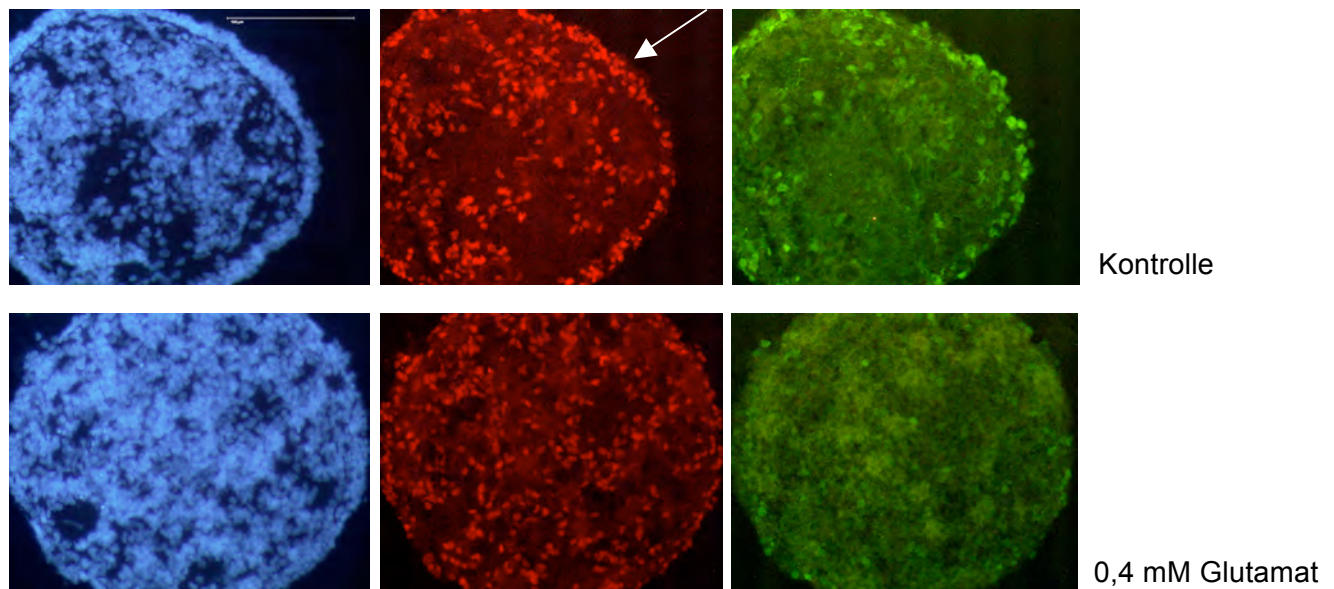


Abbildung 46: Charakterisierung der zentralen IPL-Zellen und des äußeren Zellrings mit Islet-1: nach Glutamatbehandlung fehlend. Kulturtag 6 (oben), Kulturtag 13 (unten). DAPI (blau), Islet-1 (rot), Calretinin (grün). Pfeil K 6: Islet-1 pos. Zellen in IPL. Pfeil K 13: Islet-1 pos. Zellrin

4.2.6.2 Axonin-1- Expression als Marker für IPL-Stratifizierung

Axonin-1, ein Zelladhäsionsmolekül, ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie. Axonin-1 wird in der Retina des Huhns in den Amakrinzellen der INL, in der IPL und in der Ganglienzellschicht exprimiert. Die Axonin-1 Expression ist mit der Entwicklung der Amakrinzellen und ihrer Fortsatzbildung eng verbunden (Drenhaus et al. 2004).

In den Rosettensphäroiden sind durch die Markierung der Amakrinzellfortsätze die runden IPL-Bereiche dominant Axonin-1 positiv. Nur wenige Zellkörper sind tief in der INL Axonin-1 positiv. Dadurch eignet sich dieser Antikörper hier gut für die Charakterisierung der IPL-Bildung und deren Stratifizierung. Eine Axonin-1-Expression ist im Rosettensphäroidsystem ab Kulturtag 4 detektierbar. An Kulturtag 6 bis 8 ist die Expression durch die charakteristischen, großen IPL-Bereiche am höchsten. Ab Kulturtag 10 ist keine Axonin-1-Expression im Sphäroid mehr nachzuweisen. Nach der Behandlung mit Glutaminsäure zeigt sich schon an Kulturtag 6 bei einer 0,4 mM Konzentration das Fehlen einer Axonin-1-positiven Stratifizierung in den reduzierten IPL-Bereichen (Abb. 47, oben, rechts). Die in den Kontrollen sichtbare, breite Axonin1-positive Bande in der IPL (Abb. 47, oben, links) wurde in den behandelten

Rosettensphäroiden nicht gebildet. An Kulturtag 8 sind in den behandelten Sphäroiden fast keine Axonin-1 Signale mehr vorhanden (Abbildung: 47).

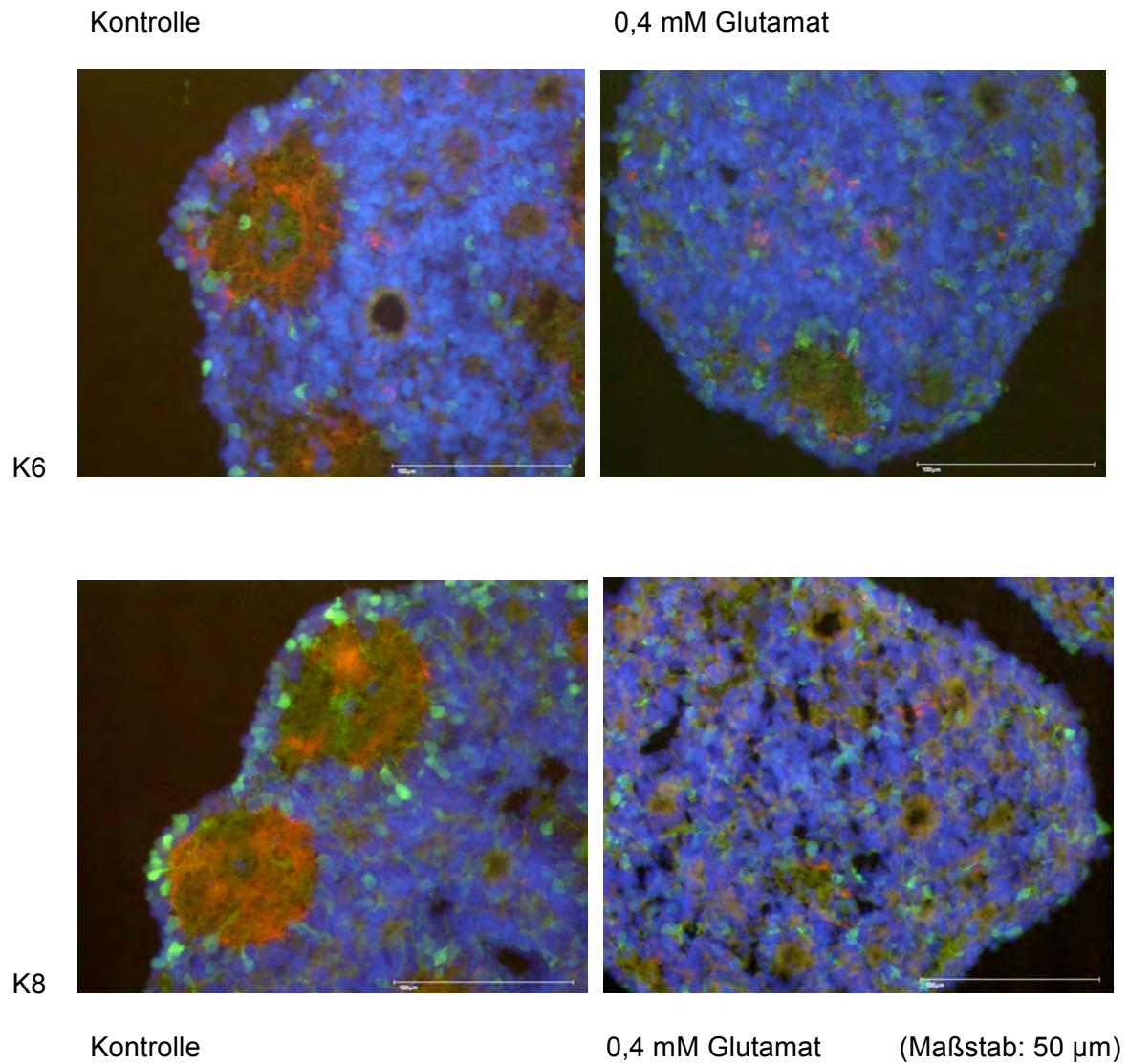


Abbildung 47: Axonin-1-Expression fehlt in Glutamat behandelten Rosettensphäroiden. Axonin -1 (rot), Calretinin (grün). K6 und K8.

4.2.6.3 Die Stratifizierung der IPL, charakterisiert durch ChAT / CRABP fehlt in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden

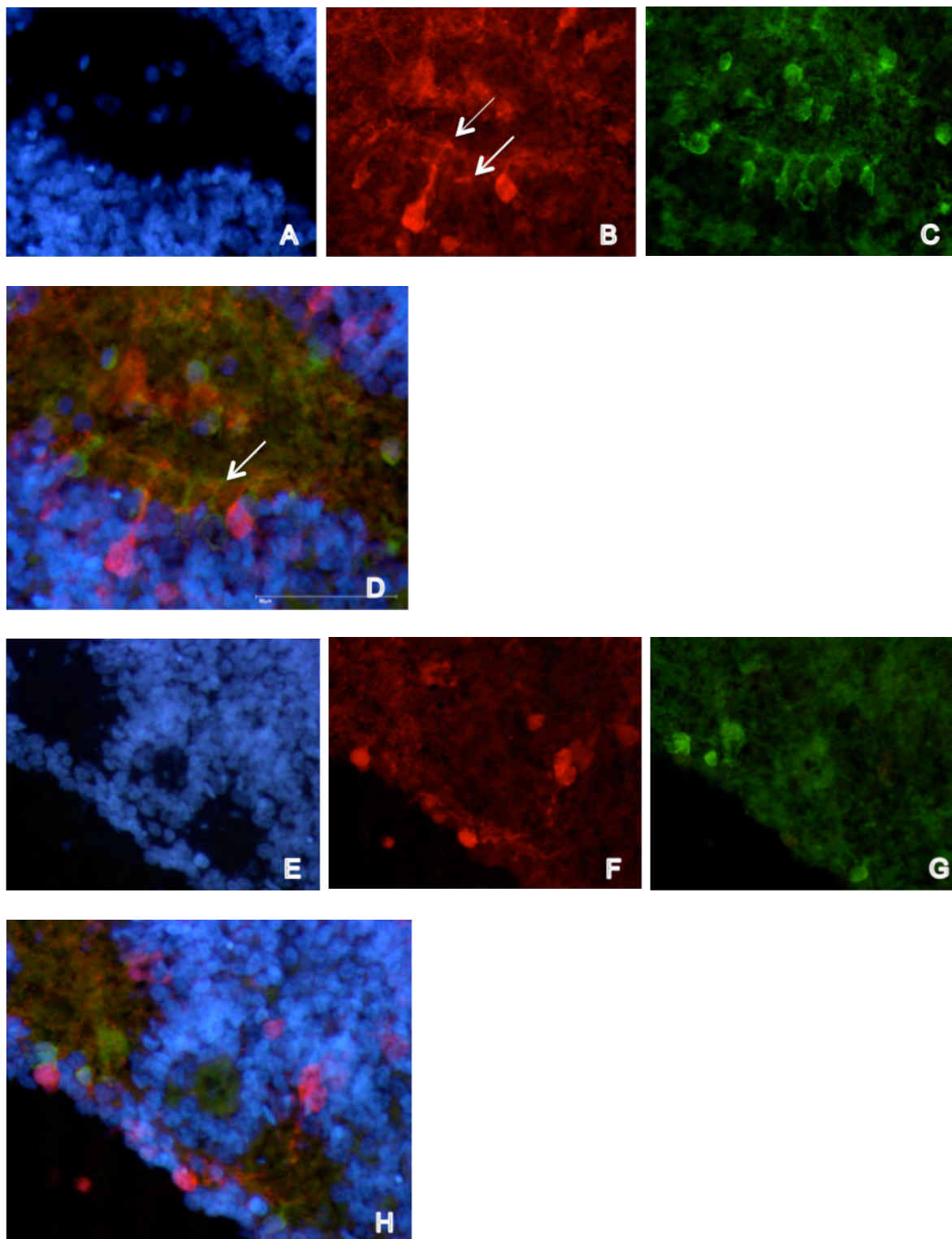


Abbildung 48: Stratifizierung der IPL markiert mit CRABP und ChAT an Kulturtage 6 fehlt nach Glutamatbehandlung vollständig. Bild A-D: Kontrolle. Pfeile in B: Zwei CRABP-Subbanden in der IPL. Pfeil in D: Subbande sowohl ChAT als auch CRABP-positiv. Bild E-H: Behandelt mit 0,4 mM Glutaminsäure: Reduktion der ChAT und CRABP-positiven Zellen und fehlende Stratifizierung der PL. DAPI (blau), ChAT (grün), CRABP (rot). Maßstab (D): 50 μ m.

In der embryonalen Hühnerretina wird CRABP (Cellular retinoic acid binding protein) von zahlreichen sich differenzierenden Amakrinzellen (Miliam et al. 1990) und Bipolarzellen (Fischer et al. 1999) exprimiert.

In der *in-vivo* Retinaentwicklung exprimieren vorübergehend einige cholinergen Amakrinzellen sowohl CRABP als auch ChAT. Sie sind in der IPL lokalisiert und entsprechen den zukünftigen cholinergen Amakrinzellen Typ II (s. 1.1.3 Abb.7), (Stanke et al. 2008). In der *in-vitro* Situation der Rosettensphäroide ist zu vermuten, dass sich ein Teil der inneren IPL-Zellen auch als Typ II cholinergen Amakrinzellen charakterisieren lässt. Des Weiteren lässt sich die Subbandenbildung in der IPL mit Hilfe des CRABP Antikörpers während der Retinaentwicklung verfolgen.

In der Rosettensphäroidentwicklung ist an Kulturtag 6 während der IPL- Bildung das CRABP Signal am stärksten. Einerseits sind die Zellkörper der CRABP-positiven Amakrinzellen sehr spezifisch markiert und andererseits sind ihre Fortsätze in charakteristischer Weise in der sich bildenden IPL angefärbt. Die CRABP-positiven Zellen bilden einen Hauptfortsatz der sich mit dem Beginn der IPL seitlich verzweigt und die erste Subbande dort bildet. Etwas tiefer in der IPL wird dann noch eine zweite Subbande gebildet (s. Pfeile Abb. 42 B). Im IPL-Bereich sind innere Zellen zu erkennen die sowohl CRABP als auch ChAT-positiv sind. Die zweite Subbande in der IPL ist auch sowohl CRABP als auch ChAT-positiv (Pfeil Abb.48 D).

In den mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroiden sind deutlich weniger Zellen um die IPL-Region CRABP-positiv (Abb.48 F). Eine Stratifizierung der IPL ist fehlend (Abb. 48 F). Auch die ChAT-positiven cholinergen Amakrinzellen sind fast vollständig fehlend (Abb. 48 G). Durch die fehlenden inneren IPL-Zellen gibt es keine Überlagerung des CRABP und des ChAT Signals mehr.

4.2.7 Die Müllergliazellen zeigen eine veränderte Zellmorphologie unter Glutamatbehandlung.

Eine weitere wichtige Zellgruppe der inneren nukleären Schicht sind die Müllergliazellen. Im Gegensatz zu den vielen unterschiedlichen Neuronentypen der Retina sind die Müllerzellen der alleinige Gliazelltyp der Vogelretina. Ihre Zellkörper befinden sich in der INL, und ihre Fortsätze durchspannen die ganze Retina und enden in der äußeren und inneren limitierenden Membran (siehe Abschnitt 1.1.3).

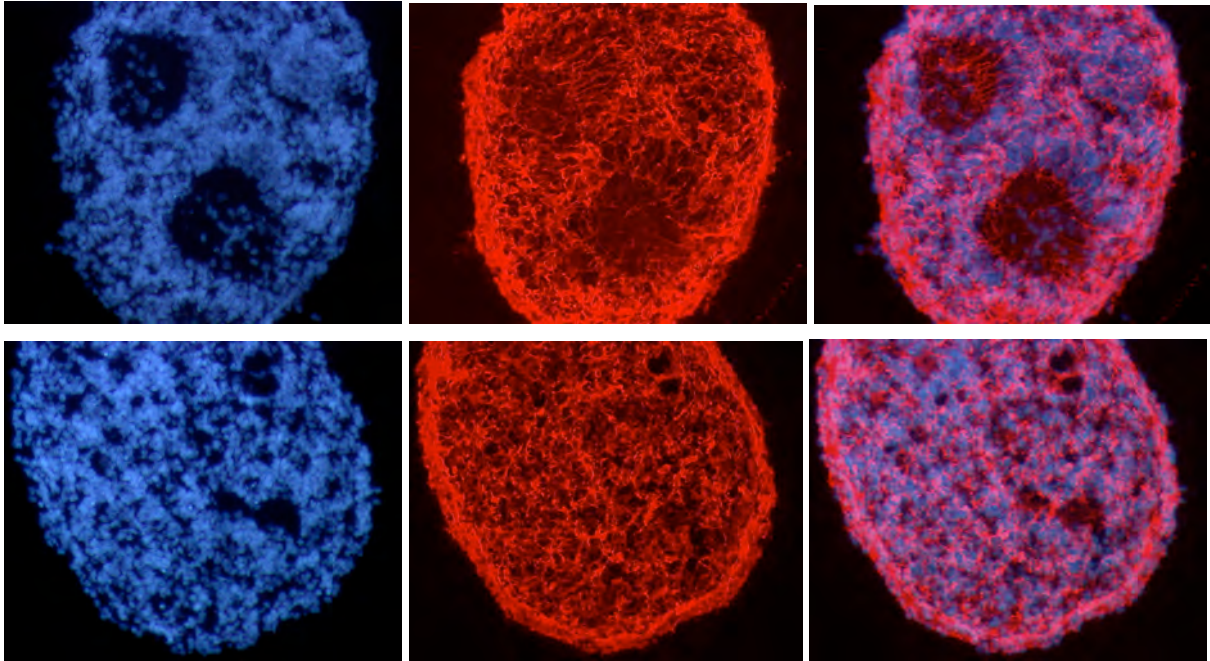
Da die Müllergliazellen sowohl von großer Bedeutung für die Entwicklung der Rosettensphäroide sind, als auch für ihre histotypischen Strukturen, ist dieser Zelltyp ein guter Marker für Veränderungen im Sphäroidsystem nach Behandlungen.

Ihr Nachweis erfolgt mit verschiedenen Müllerzell-spezifischen Antikörpern. Zum einen mit dem Antikörper gegen Glutaminsynthetase (Prada et al. 1998). Glutaminsynthetase wird in der Retina ausschließlich von differenzierten Müllerzellen exprimiert. Dieses Enzym dient dem sogenannten Transmitter - Recycling. Die Müllerzellen nehmen den von den Neuronen freigesetzten Transmitter Glutamat auf und wandeln ihn mittels ihres spezifischen Enzyms Glutaminsynthetase in das unwirksame Vorläufermolekül Glutamin um (Abb. 49,50). Des Weiteren erfolgt der Nachweis der Müllerzellen mit einem Antikörper gegen Vimentin. Vimentin ist ein Intermediärfilament, das in der Retina nur von den Müllerzellen exprimiert wird (Abb. 51).

Bei der Antikörperfärbung mit Glutaminsynthetase wird schon bei geringer Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop deutlich, dass die Müllergliazellen im Rosettensphäroid auf die Glutamatbehandlung nicht mit einer mengenmäßigen Reduktion, sondern mit einer Auflösung ihres organisierten Müllergliaskeletts reagieren. Die langen radiären Fortsätze fehlen oder sind stark verkürzt. Eine radiäre Struktur der Müllerzellfortsätze in den reduzierten IPL-Bereichen ist nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 50 C).

Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass die Zellkörper der Müllerzellen der behandelten Rosettensphäroide gedrungener sind, als die der Kontrollen (siehe Pfeil Abbildung 50 D) Die Zellkörper der Müllerzellen in den Kontrollen sind langgestreckt, der INL-Schicht zuzuordnen und besitzen lange Fortsätze in der INL und in die IPL hinein (siehe Abb. 50 A und B: Pfeil). Da das Müllerzellskelett in Rosettensphäroiden erst ab Kulturtag acht oder neun vollständig ausgebildet ist, stellt sich die Wirkung des Glutamats zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten dar.

K10 Kontrolle



K10 0,4 mM Glutamat

Abbildung 49: Glutaminsynthetase-Antikörperfärbung zum Müllerglianachweis. Kulturtag 10, DAPI, Glutaminsynthetase, overlay. Oben: Kontrolle, unten: 0,4 mM Glutaminsäure.

K9 Kontrolle

0,4 mM Glutamat

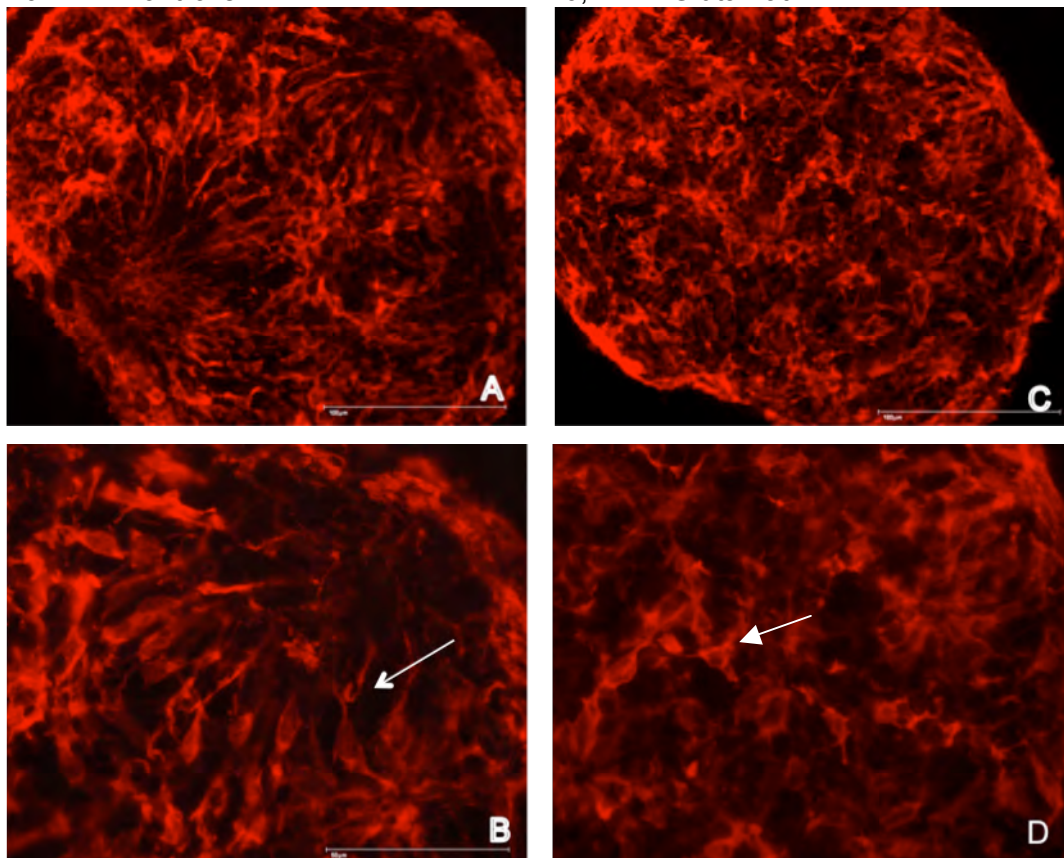
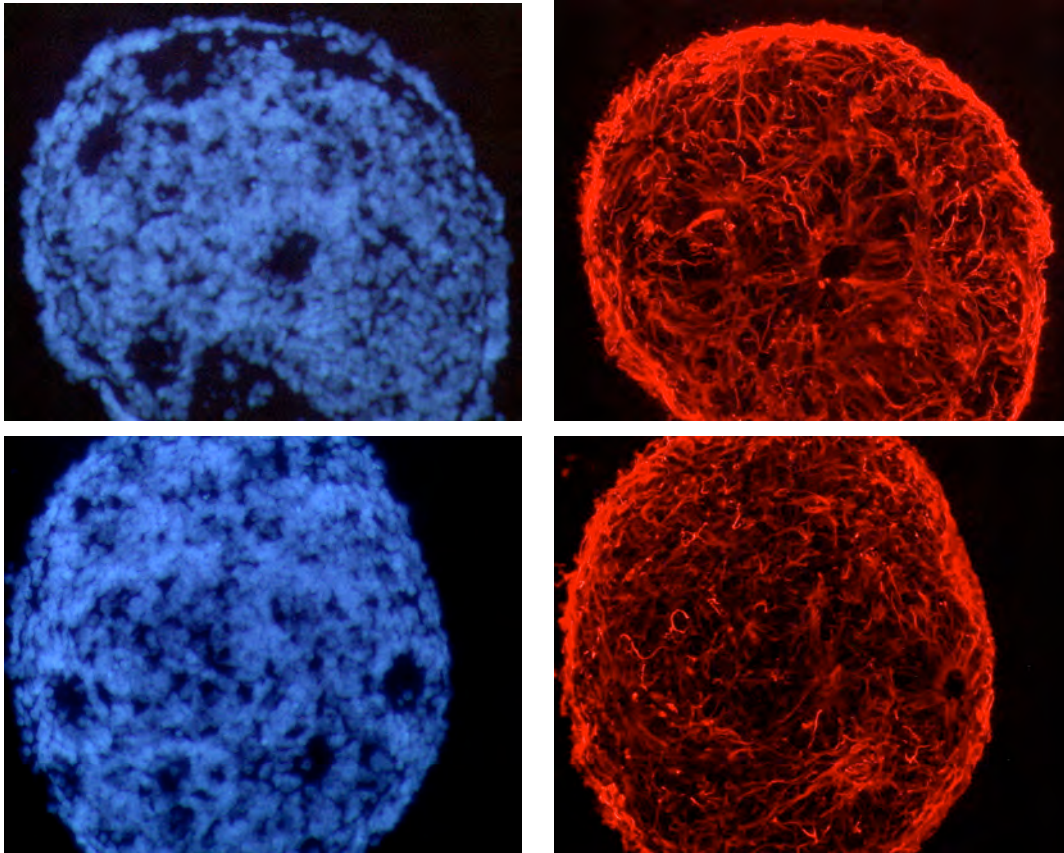


Abbildung 50: Fehlende Müllergliafortsätze und gedrungene Zellkörper in Rosettensphäroiden nach Glutamatbehandlung. Kulturtag 9, Glutaminsynthetase.: A,B: Kontrolle, Maßstab:100 µm. (B: langer Pfeil, kleiner Gliazellkörper mit langen Fortsätzen). C,D: 0,4 mM Glutaminsäure, Maßstab: 50 µm. (D: kurzer Pfeil, gedrungener Zellkörper ohne Fortsätze).

Vimentin

K12 Kontrolle



K12 0,4 mM Glutamat

Abbildung 51: Verlust der langen Müllerzellfortsätze in Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroiden markiert mit dem Vimentinantikörper. Oben: Kontrollen, unten: 0,4 mM Glutaminsäure behandelte Rosettensphäroide an Kulturtag 12.

Die mit dem Vimentin-Antikörper gefärbten Kryostatschnitte bestätigen das Ergebnis der Glutaminsynthetase-Antikörperfärbung. Die langen Fortsätze der Müllerzellen sind stark verkürzt oder fehlend und verlaufen ungeordnet. Der Vimentin-positive Ring um das Sphäroid ist in den Kontrollen gleichmäßig dick, hingegen in den mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Sphäroiden dünner und teilweise unterbrochen (Abb.51).

Die frühesten Effekte durch Glutamat an den Müllerzellen lassen sich hier in den Sphäroiden mit der Glutaminsynthetase und der Vimentin - Antikörperfärbung ab Kulturtag acht beobachten. Dies gilt somit nur für ausdifferenzierte Müllergliazellen.

4.2.8 Äußere Retina: Die Anzahl der Photorezeptoren in den Rosettensphäroiden wird durch die Glutamatbehandlung erhöht.

Im Gegensatz zu den vielen unterschiedlichen Zelltypen der inneren Retina wird die äußere Retina hauptsächlich durch die lichtempfindlichen Neuronen, den Photorezeptoren charakterisiert. Diese befinden sich in der äußeren, nukleären Schicht (ONL) und sind in zwei Haupttypen unterteilt, die Stäbchen und die Zapfen. Die Zapfen verantwortlich für das Farbsehen, untergliedern sich in weitere Subtypen (siehe 1.1.3).

In der Entwicklung der Hühner-Retina differenzieren *in-vivo* an Embryonaltag 14 im zentralen Bereich zuerst die roten und grünen Zapfen. An Embryonaltag 15 erscheinen dann die Stäbchen, auch zuerst im zentralen Bereich der Retina. Bei der Betrachtung der prozentualen Verteilung der Photorezeptoren in der ONL stellen die roten und grünen Zapfen mit über 60 Prozent den größten Anteil, gefolgt von den Stäbchen mit ca. 19 Prozent. Ein geringer prozentualer Anteil entfällt auf die blauen und violetten Zapfen mit jeweils ca. 7 Prozent.

In den Rosettensphäroiden sind die Photorezeptoren einerseits in den teilweise organisierten Bereichen, den Rosetten, zu finden. Andererseits liegen sie auch in den unorganisierten Bereichen (intermediäre Bereiche) zwischen den Rosetten und den IPL-Bereichen, wo sie als ‚displaced photoreceptors‘ bezeichnet werden (Abb. 52 B). Ihre Zellkörper sind hier meist abgerundet mit einem oder mehreren kurzen Fortsätzen. Im Gegensatz dazu besitzen die Photorezeptoren der Rosetten einen länglichen Zellkörper und Bruchstücke äußerer Segmente, die ins Lumen der Rosette ragen (Abb. 52 C, D). Sie sind in der Rosette in einem Zellring angeordnet und besitzen meist einen Hauptfortsatz, der in die inneren plexiformen Bereiche projiziert und sich dort aufzweigt (Abb. 52 C, E).

In den unorganisierten Bereichen der Rosettensphäroide steht jedem Stäbchen ein Zapfen gegenüber. Dieses Verhältnis ändert sich in den teilweise organisierten Bereichen, den Rosetten, hier stehen 3 Stäbchen 4 rot/grüne Zapfen gegenüber. Mit zunehmendem Organisationsgrad reduziert sich der Anteil der Stäbchen. Dagegen scheint der Entwicklung der Zapfen nicht von der Organisation des Gewebes abzuhängen (Doktorarbeit A. Rothermel, 2000).

Die Photorezeptoren können durch verschiedene Antikörper in der Retina *in-vivo*, oder im Rosettensphäroid *in-vitro* sichtbar gemacht werden. Differenzierte Stäbchen können einerseits durch den monoklonalen Antikörper rho4D2 (gegen Rinder-Rhodopsin) und andererseits mit dem polyklonalen Antikörper Cern 901 (gegen Rhodopsin des Huhns) nachgewiesen werden. Adulte Zapfen werden mit dem polyklonalen Antikörper Cern 906 (gegen rote und grüne Opsine des Huhns) nachgewiesen. Des Weiteren gibt es einen monoklonalen Antikörper gegen Visinin. Visinin ist ein Protein, das in allen Photorezeptor-Typen exprimiert wird (Fischer et al. 2008). Sobald die Photorezeptoren in der Retina postmitotisch sind, kann eine Visinin- Expression detektiert werden.

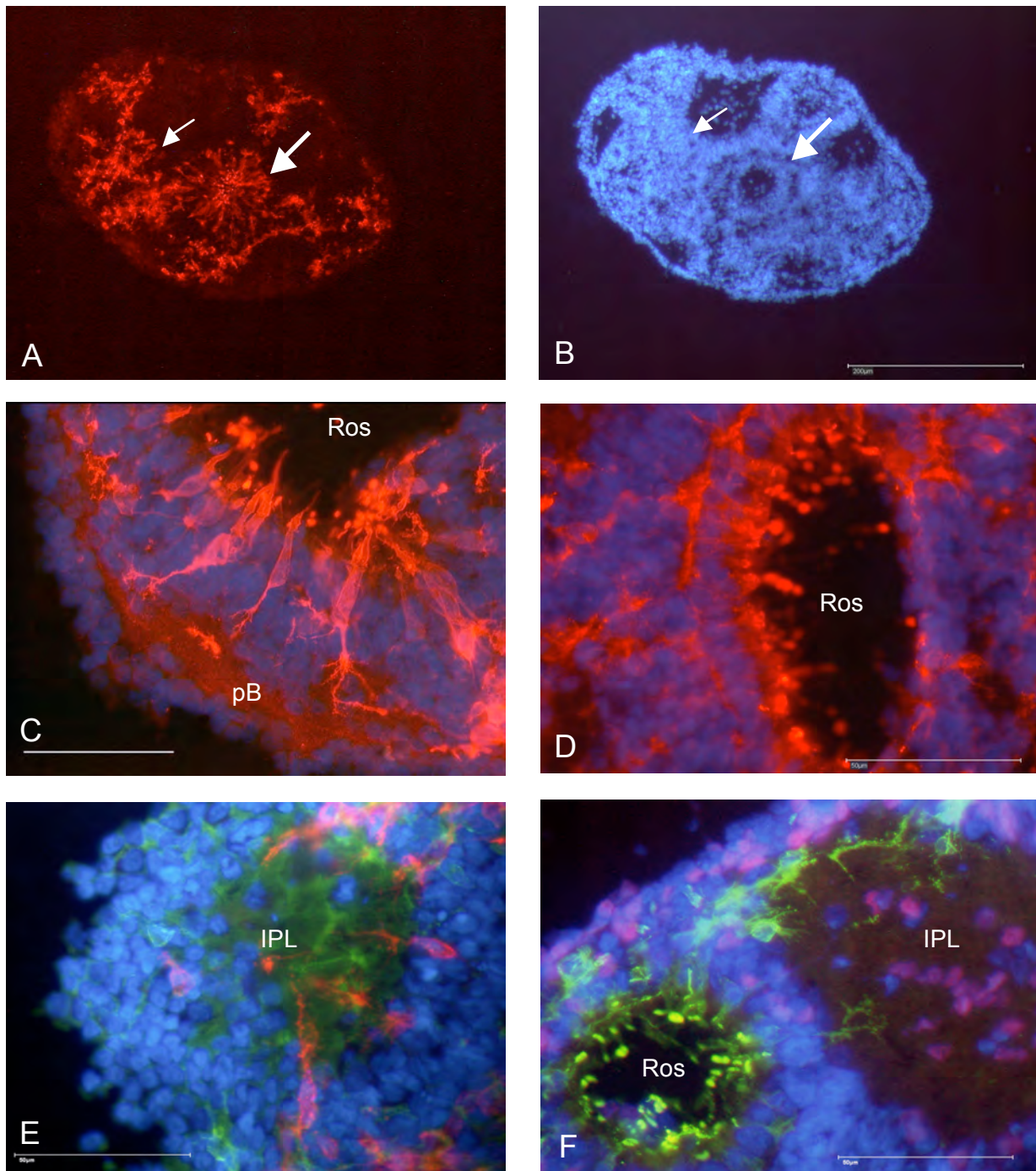


Abbildung 52: Stäbchen und Zapfen im Rosettensphäroid.

A: Markierung der Stäbchen durch rho4D2-Antikörperfärbung Kulturtag 9: Stäbchen in Rosetten (großer Pfeil) und in unorganisierten Bereichen (kleiner Pfeil). **B:** Kernfärbung mit DAPI von A. **C:** Stäbchen in Rosette (Cern 901) mit äußeren Segmenten in Rosette und Fortsätze, die in plexiforme Bereiche projizieren. Kulturtag 13. **D:** Zapfen in Rosette (Cern 906). Kulturtag 13. **E:** Stäbchen (rho4D2), rot und Zapfen (Cern 901), grün mit Projektionen in innere plexiforme Schicht. Kulturtag 7. **F:** Stäbchen (Cern 901), grün in Rosette und Fortsätze in IPL. INL-Zellpopulation und innere IPL-Zellen (Islet-1), rot. Kulturtag 7.

Ros: Rosette, IPL: Inner Plexiform Layer, pB: plexiformer Bereich.
Kryostatschnitte. Maßstäbe: A,B: 200 µm, C-F: 50 µm.

Bei der Kultivierung von Rosettensphäroiden aus sechs Tage alter Retina sind die ersten wenigen Photorezeptoren an Kulturtag vier durch Antikörperfärbungen nachzuweisen. Sie liegen außen am Rand des Sphäroids. Im weiteren Verlauf der Kultivierung erscheinen die Stäbchen und Zapfen im Rosettensphäroid-Inneren und sind meist durch lange Fortsätze charakterisiert, die teilweise bis in die inneren plexiformen Bereiche projizieren. Mit dem Größerwerden der Rosetten ordnen sich die Photorezeptoren in der ONL an. In den unorganisierten Bereichen liegen anfangs noch viele Photorezeptoren, werden aber mit zunehmender Differenzierung der Rosettensphäroide deutlich weniger (Abb. 53).

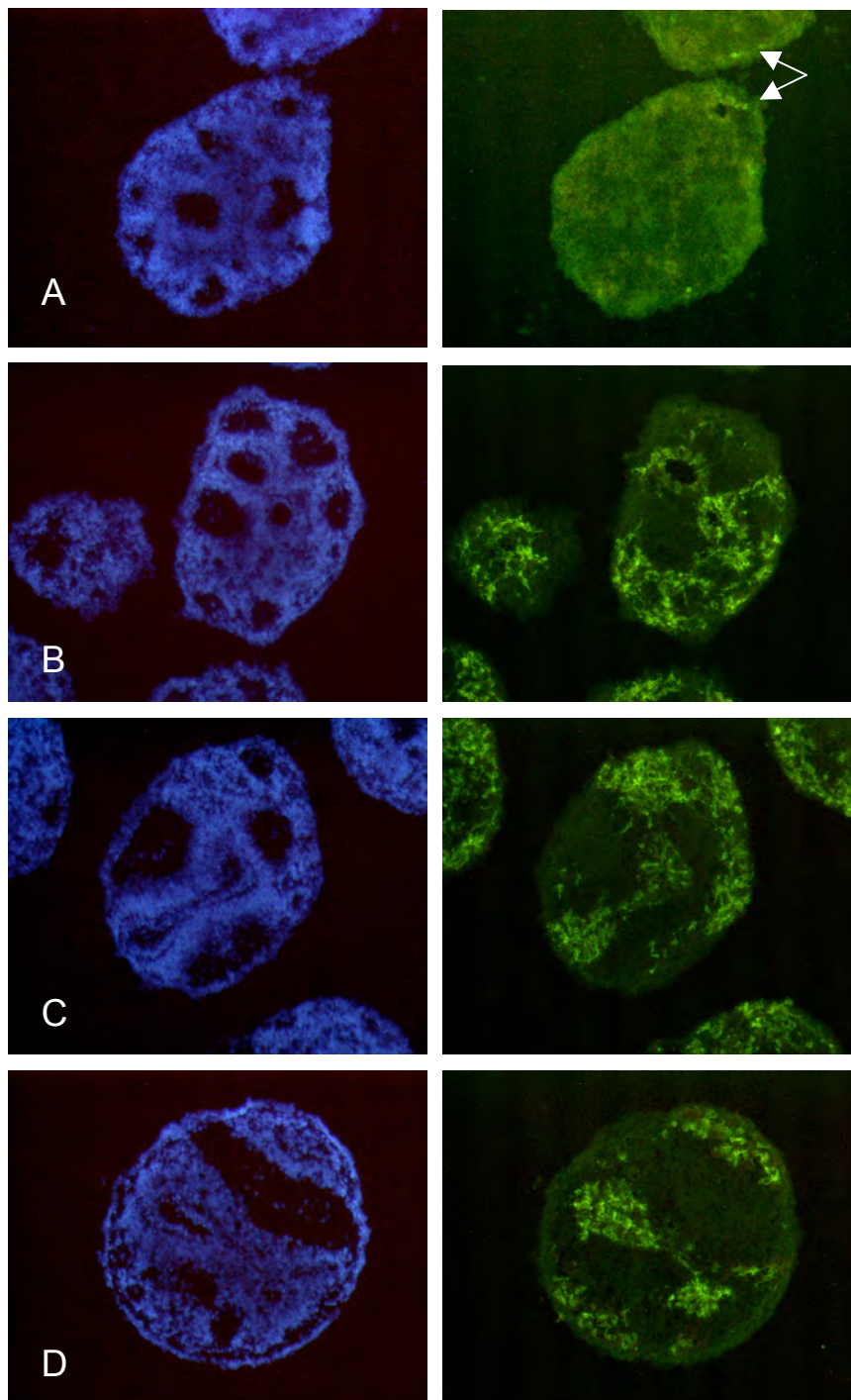


Abbildung 53:
Stäbchendifferenzierung in der
Rosettensphäroidentwicklung.
 Stäbchen (Cern 901, grün) an
 Kulturtag 4 (A), 6 (B), 8 (C), 12
 (D). (links: DAPI, rechts C.901)

Mit dem Antikörper gegen Visinin lassen sich schon ab Kulturtag 2 viele zukünftigen Photorezeptoren detektieren. Auch die noch kleinen Rosettenkeime sind mit dieser Antikörperfärbung im Sphäroid nachzuweisen (siehe Abbildung 54: Pfeile).

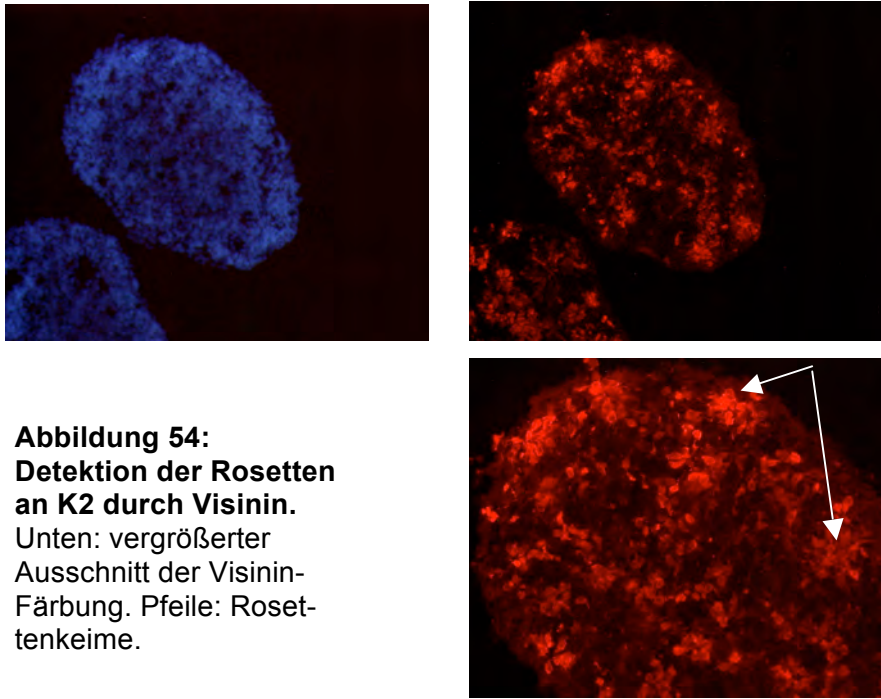


Abbildung 54:
Detektion der Rosetten
an K2 durch Visinin.
Unten: vergrößerter
Ausschnitt der Visinin-
Färbung. Pfeile: Roset-
tenkeime.

Während der Rosettensphäroid-Entwicklung projizieren einige Photorezeptoren in die inneren plexiformen Bereiche zu den dort liegenden inneren Zellen. Sie zeichnen sich durch sehr lange, verzweigte Fortsätze aus (siehe Abbildung 52 E). Teilweise sind direkte Kontakte zu den Photorezeptoren der Rosetten nachweisbar (siehe Abbildung 52 F).

Die Glutaminsäurebehandlung der Rosettensphäroide zeigte in Bezug auf die Photorezeptoren charakteristische Auswirkungen, die den Auswirkungen auf die IPL-Zellen entgegengesetzt ist. Die Menge der Stäbchen und Zapfen in den intermediären, unorganisierten Bereichen ist deutlich höher als in den Kontrollen. Die Glutaminsäure-Behandlung zeigt schon ab Kulturtag vier ein Behandlungsergebnis. Im äußeren Randbereich des Sphäroids können mehr Photorezeptoren detektiert werden (siehe Abbildung 58). Dieser Effekt ist an Kulturtag 4 noch gering, verstärkt sich aber deutlich zwei Tage später. Besonders in den größeren intermediären Bereichen sind mehr Stäbchen oder Zapfen durch die entsprechenden Antikörperfärbungen markiert. Die mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Rosettensphäroide zeigen diesen Effekt stärker als die mit 0,2 mM Glutaminsäure behandelten Sphäroide (Abbildung 55).

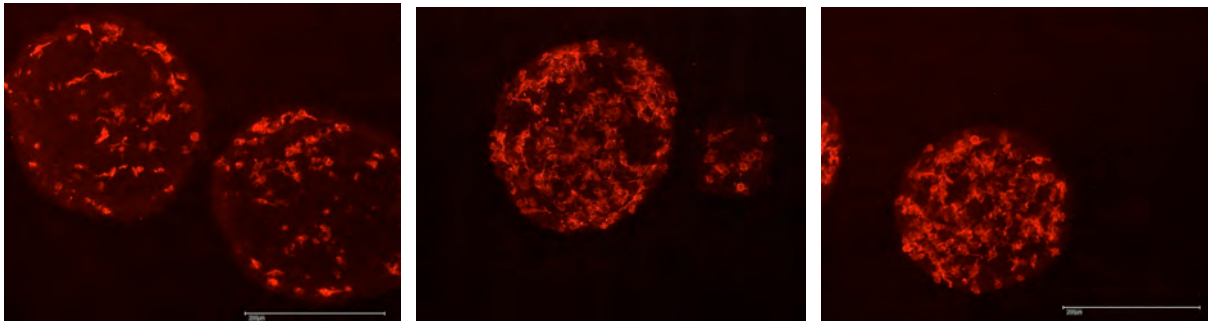


Abbildung 55: Zunahme des Glutamateffekts mit steigender Konzentration. Stäbchen (rho 4D2), K 15. Von links nach rechts: Kontrolle, 0,2 mM, 0,4 mM Glutaminsäure. Maßstab: 200 µm.

Während der Kultivierungsdauer der Rosettensphäroide wird der Unterschied zwischen den behandelten Proben und den Kontrollen immer signifikanter (siehe Diagramm Abb. 56). In den Kontrollen befinden sich ab Kulturtag 10 nur noch wenige Photorezeptoren in den intermediären Bereichen, sie sind im Wesentlichen in den Rosetten zu detektieren. In den behandelten Sphäroiden dagegen sind zunehmend viele Stäbchen und Zapfen in den intermediären Bereichen angefärbt, zusätzlich zur Zunahme dieser Flächen. Ihre Zellkörper sind abgerundet. Gleichzeitig sind hier auch Photorezeptoren in den Rosetten markiert, die längliche Zellkörper aufweisen (Abbildung 57, 58).

Sowohl bei der Markierung der Stäbchen durch rho 4D2 und Cern 901, als auch bei der Markierung der Zapfen durch Cern 906, ist dasselbe Ergebnis durch die Glutaminsäurebehandlung zu beobachten. Auch bei der Gesamtmenge der Photorezeptoren und deren Vorläufer, durch Visinin markiert, lässt sich die signifikante Zunahme bestätigen (Abbildung 58, 59)

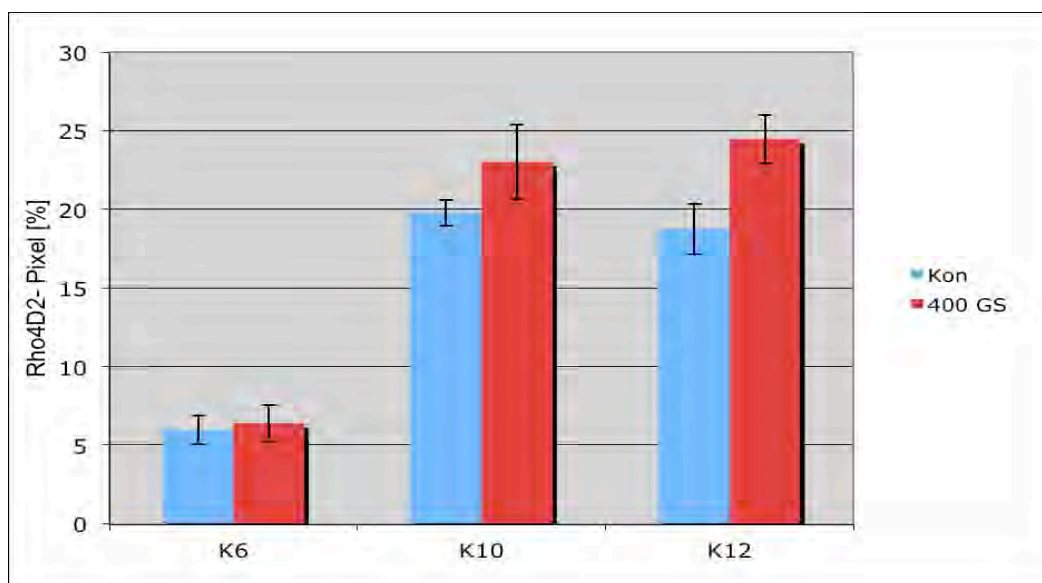
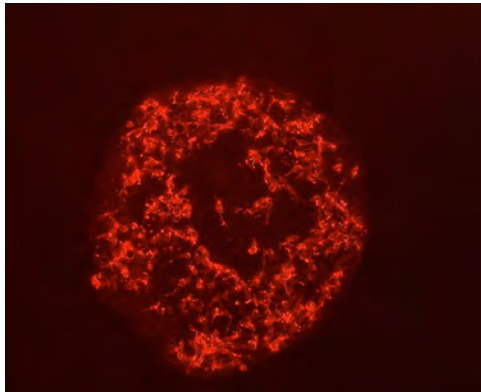
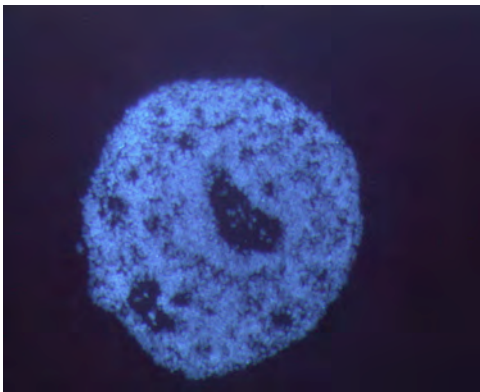
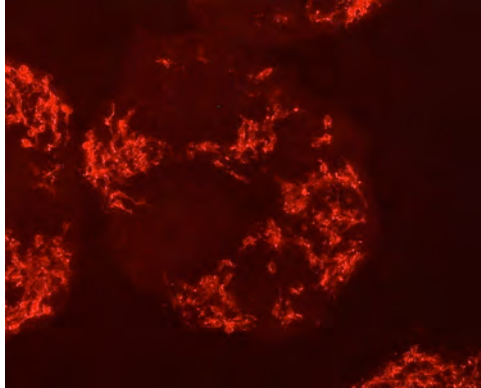
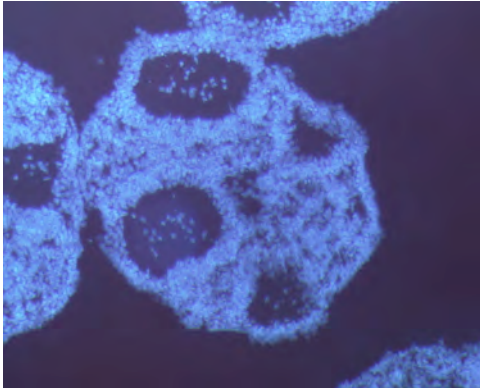


Abbildung 56: Der Anteil der Stäbchen an der Gesamtsphäroidfläche steigt mit der Kultivierungsdauer in den Glutamat-behandelten Sphäroiden stärker an als in den Kontrollen. In Kontrollen (blau) und mit 0,4 mM Glutaminsäure behandelten Proben (rot) an Kulturtag 6, 10 und 12. (Der Anteil des rho4D2-Signals an der Gesamtfläche der Sphäroidschnitte (n=15) wurde mittels ImageJ ermittelt und prozentual dargestellt).

Stäbchen (rho 4D2)

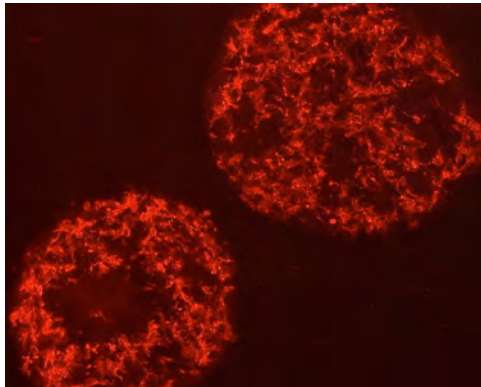
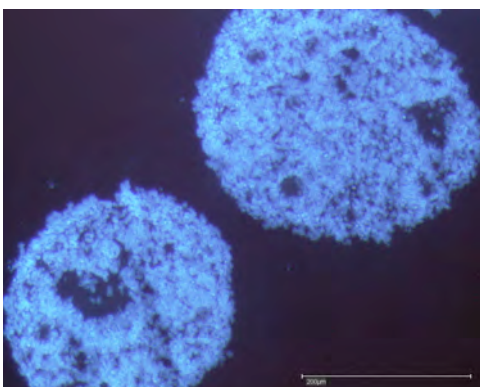
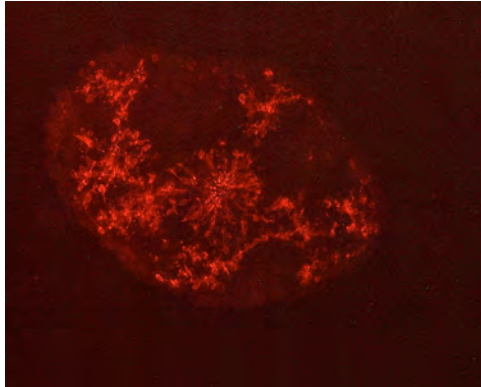
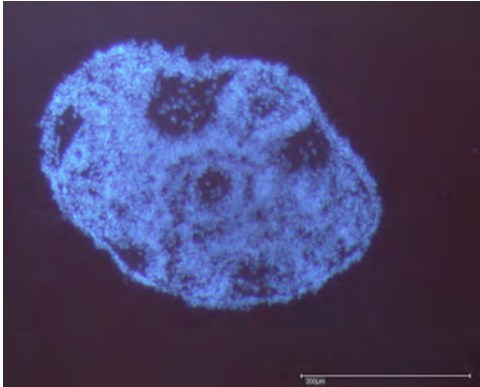
Abbildung 57: Legende Seite 102

K7 Kontrolle



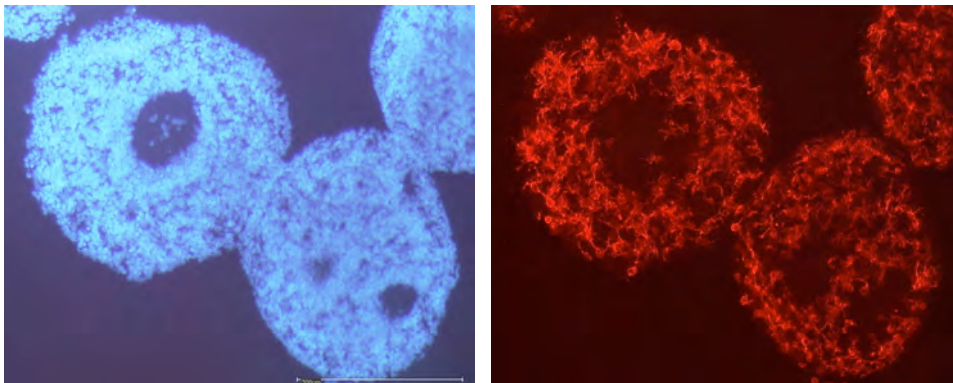
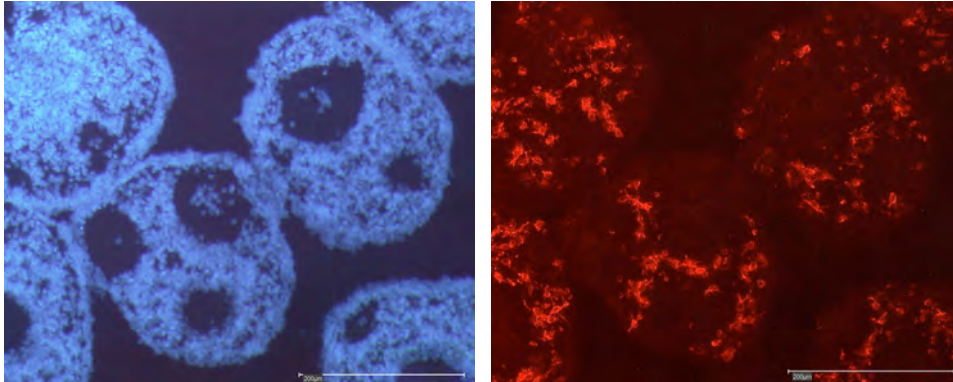
K7 0,4 mM Glutamat

K9 Kontrolle



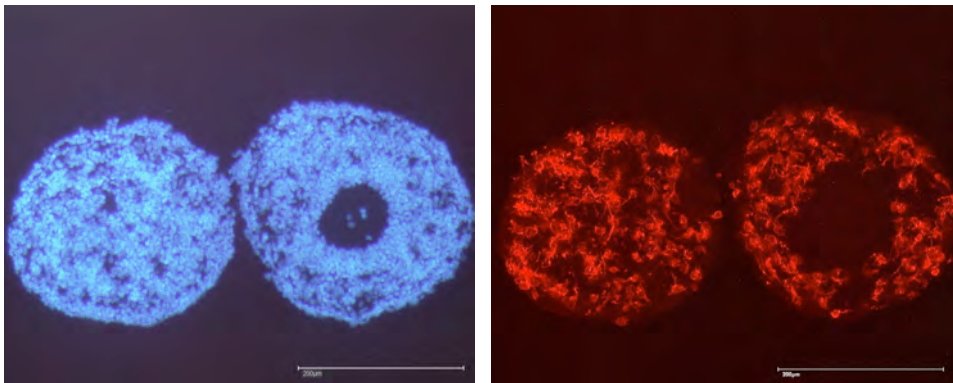
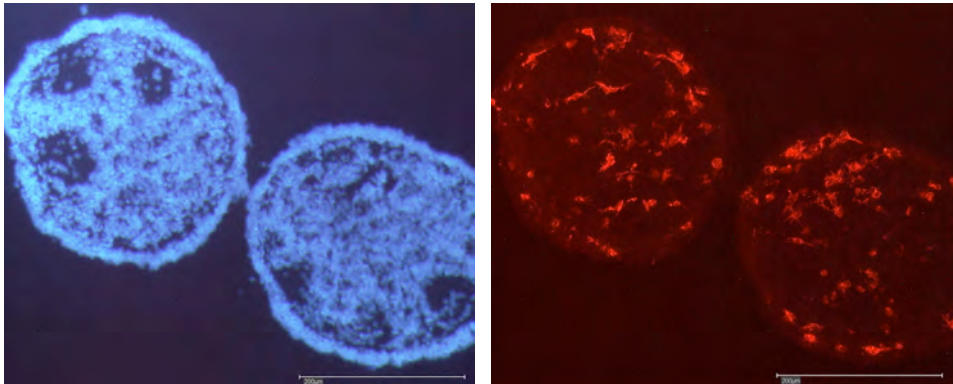
K9 0,4 mM Glutamat

K11 Kontrolle



K11 0,4 mM Glutamat

K13 Kontrolle



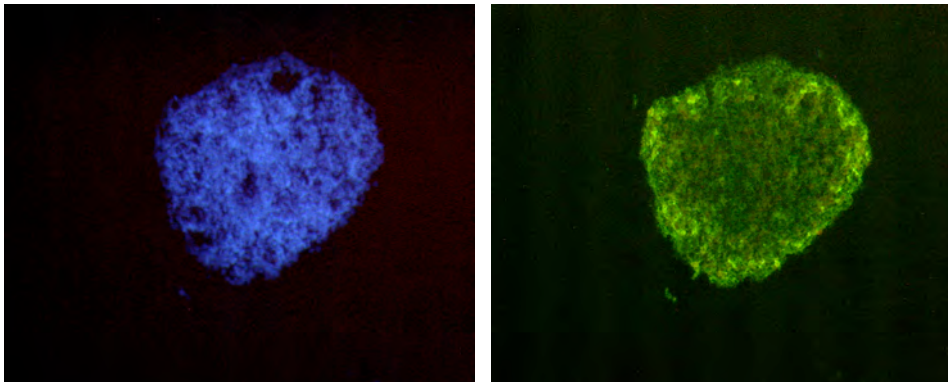
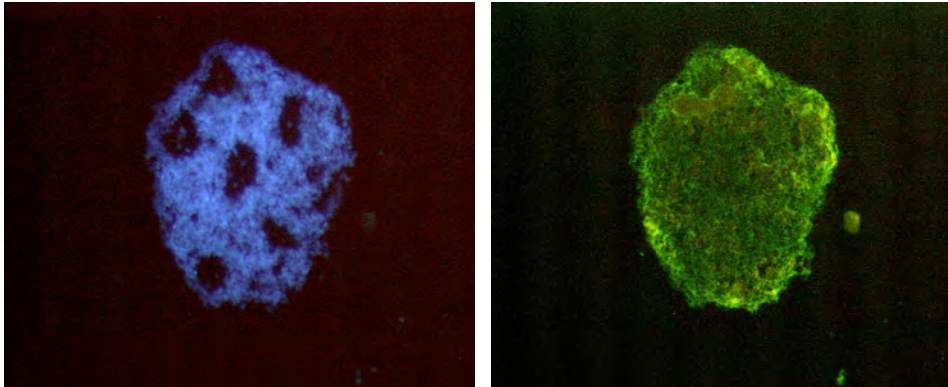
K13 0,4 mM Glutamat

Abbildung 57: Zunahme der Stäbchen in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden während der Kultivierung an Kulturtag 7, 9 und 13. Stäbchen (rho 4D2) und DAPI- Färbung an Kulturtag 7, 9, 11, 13. Kontrollen und 0,4 mM Glutaminsäure. Maßstab: 200 µm.

Zapfen (Cern 906)

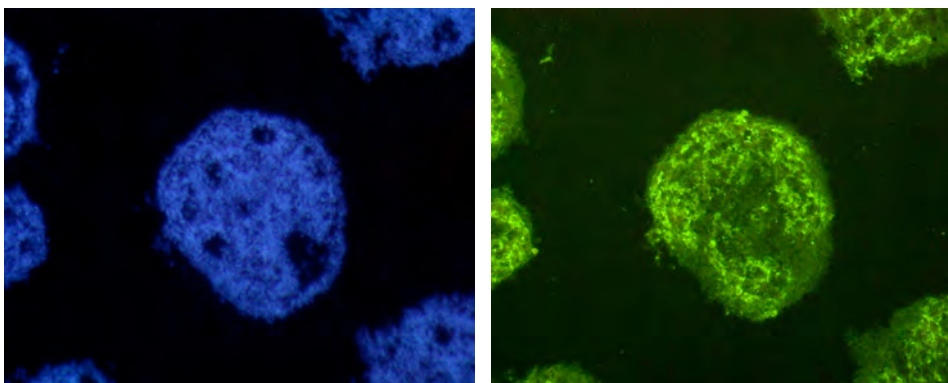
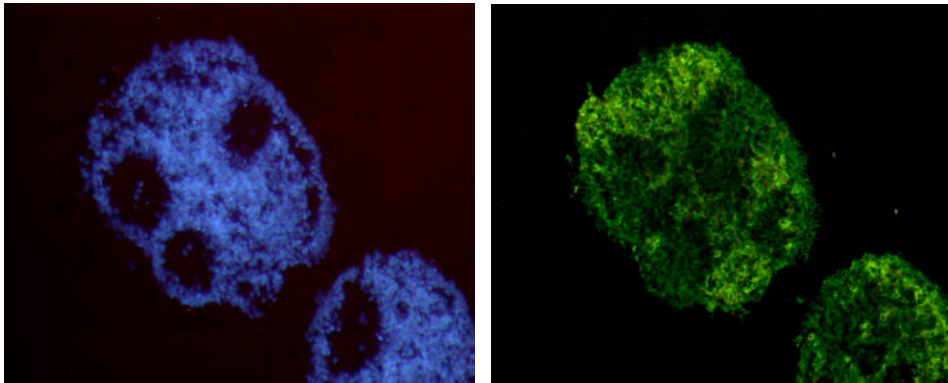
Abbildung 58: Legende Seite 104

K4 Kontrolle



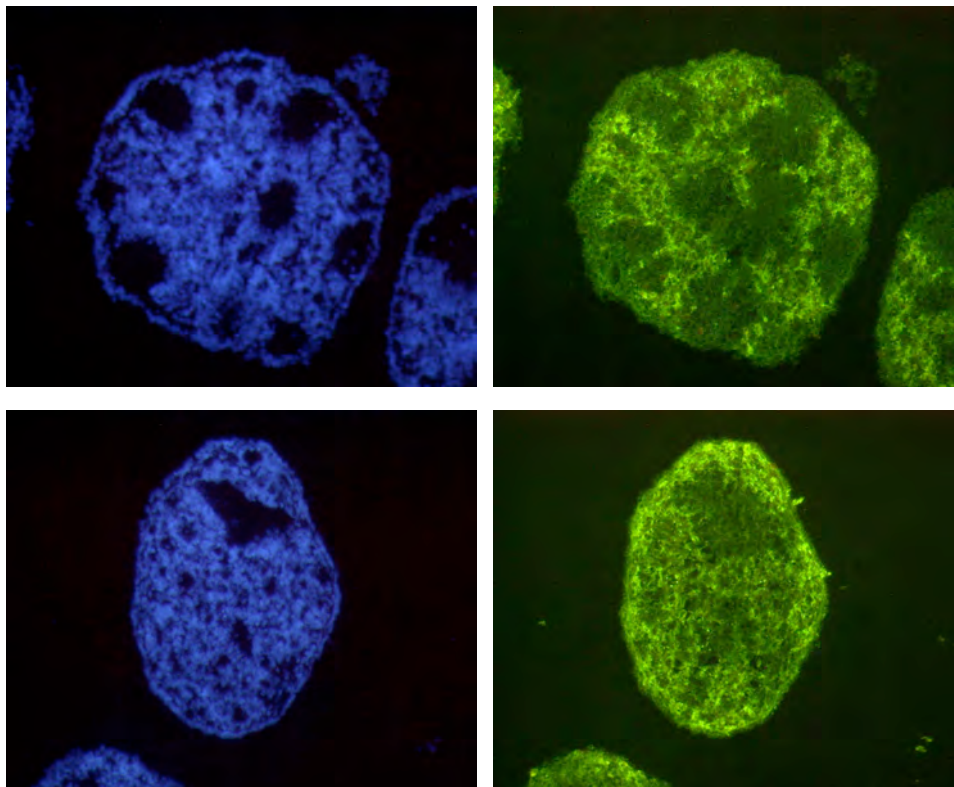
K4 0,4 mM Glutamat

K6 Kontrolle



K6 0,4 mM Glutamat

K8 Kontrolle

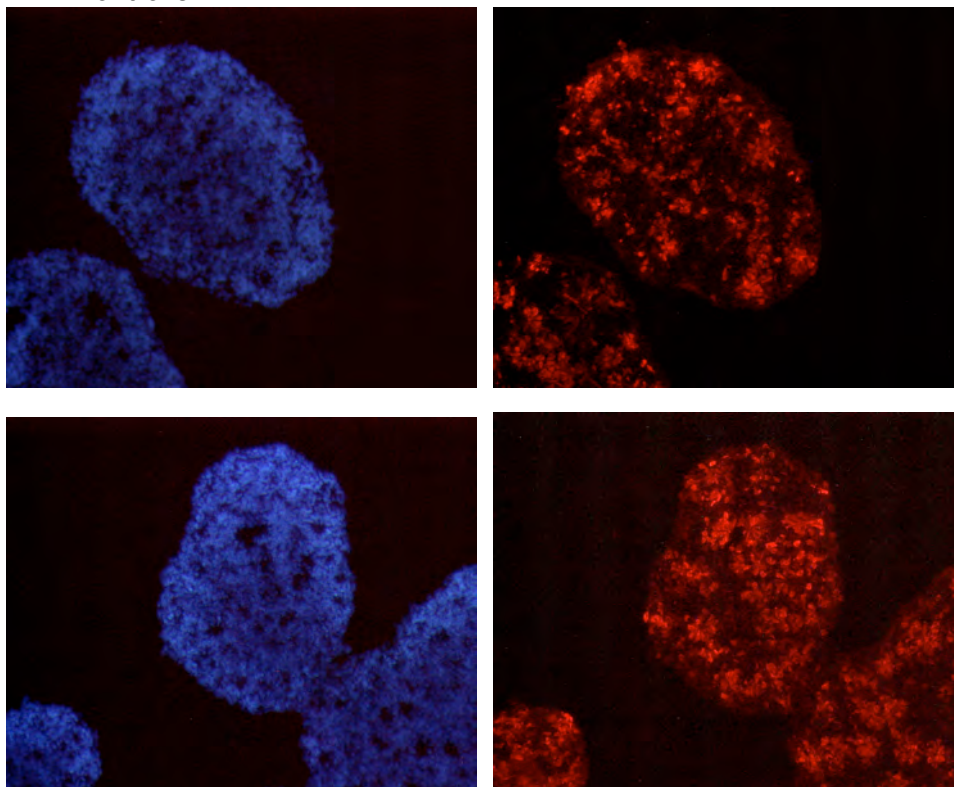


K8 0,4 mM Glutamat

Abbildung 58: Zunahme der Zapfen in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden während der Kultivierung von Kulturtag 4 bis 8. Zapfen (Cern 901) Kulturtag 4, 6, 8. Kontrollen und 0,4 mM Glutaminsäure.

Visinin

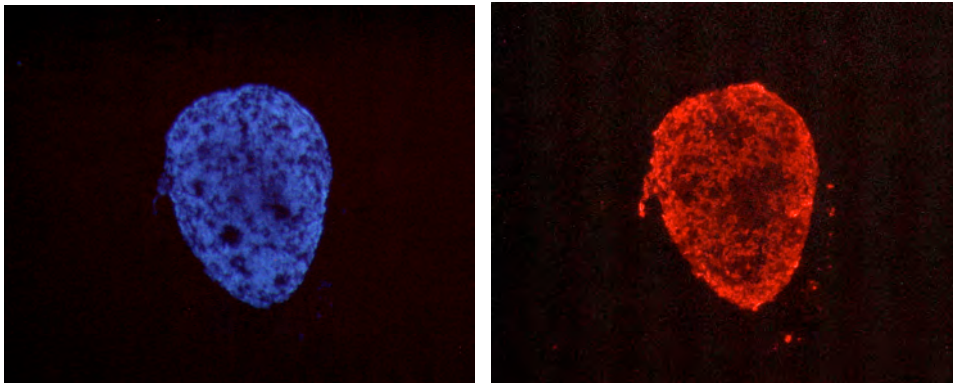
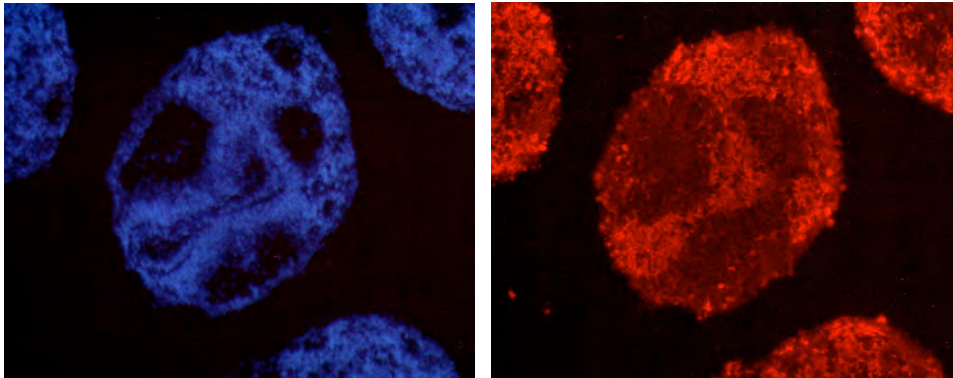
K2 Kontrolle



K2 0,4 mM Glutamat

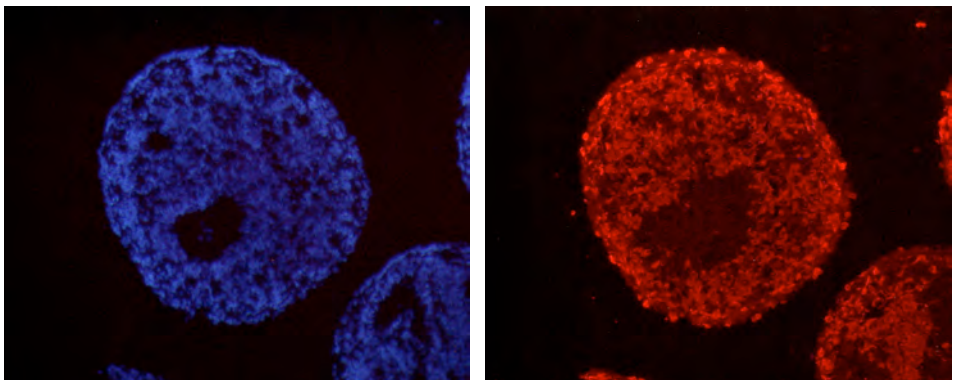
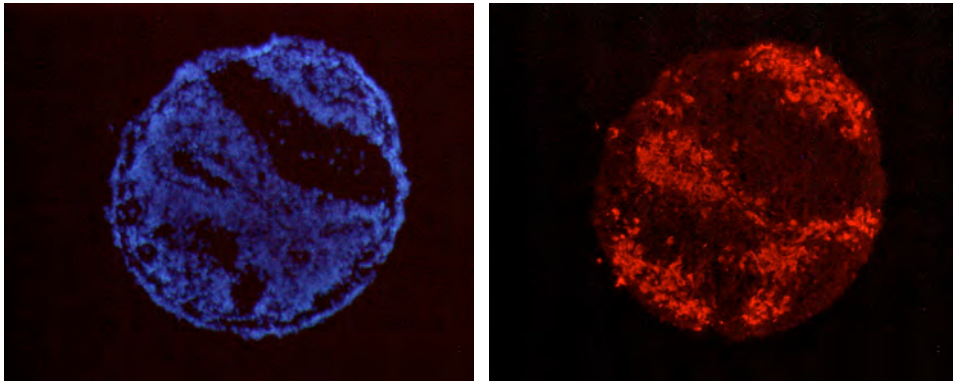
Abb 59: Legende S. 105

K8 Kontrolle



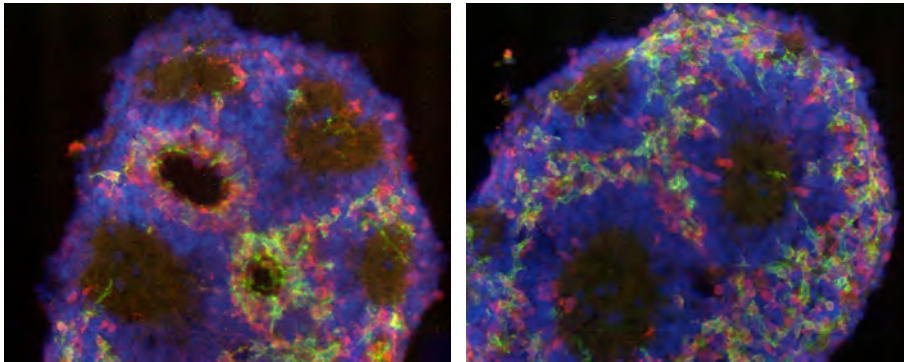
K8 0,4 mM Glutamat

K12 Kontrolle



K12 0,4 mM Glutamat

Abbildung 59: Vermehrte Photorezeptorenvorläufer-Signale für Glutamat-behandelte Rosettensphäroide beginnend an Kulturtag 2. Visinin, DAPI an K2, 8, 12. Kontrolle und 0,4 mM Glutaminsäure.



K6 Kontrolle

0,4 mM Glutamat

Abbildung 60: Mehr Photorezeptorenvorläufer und differenzierte Photorezeptoren in den unorganisierten Bereichen der Glutamat-behandelten Rosettensphäroide. Doppelfärbung Visinin (rot), Cern 901 (grün) an K6. Kontrolle und 0,4 mM.

4.2.8.1 Glutamat erhöht die mRNA-Expression von Opsin und Rhodopsin

Die in Abschnitt 4.2.4.3 beschriebenen histologischen Ergebnisse zeigen mit Hilfe von spezifischen Antikörperfärbungen eine signifikante Zunahme von Stäbchen und Zapfen nach der Glutamatbehandlung. Diese Zunahme der Photorezeptoren in den Rosettensphäroiden wurde durch eine PCR auf RNA-Expressionsebene überprüft.

Rosettensphäroide wurden an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8, 10, 12 als Homogenate für die RNA-Isolierung geerntet (parallel dazu wurden auch Sphäroide für Kryostatschnitte fixiert). Die wie in Punkt 3.2.11 beschrieben isolierte RNA wurde in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Ausgangsmaterial für eine semi-quantitative PCR. Die Amplifikate für GAPDH, Rhodopsin und rotes Opsin der behandelten und unbehandelten Rosettensphäroide, wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

Rhodopsin

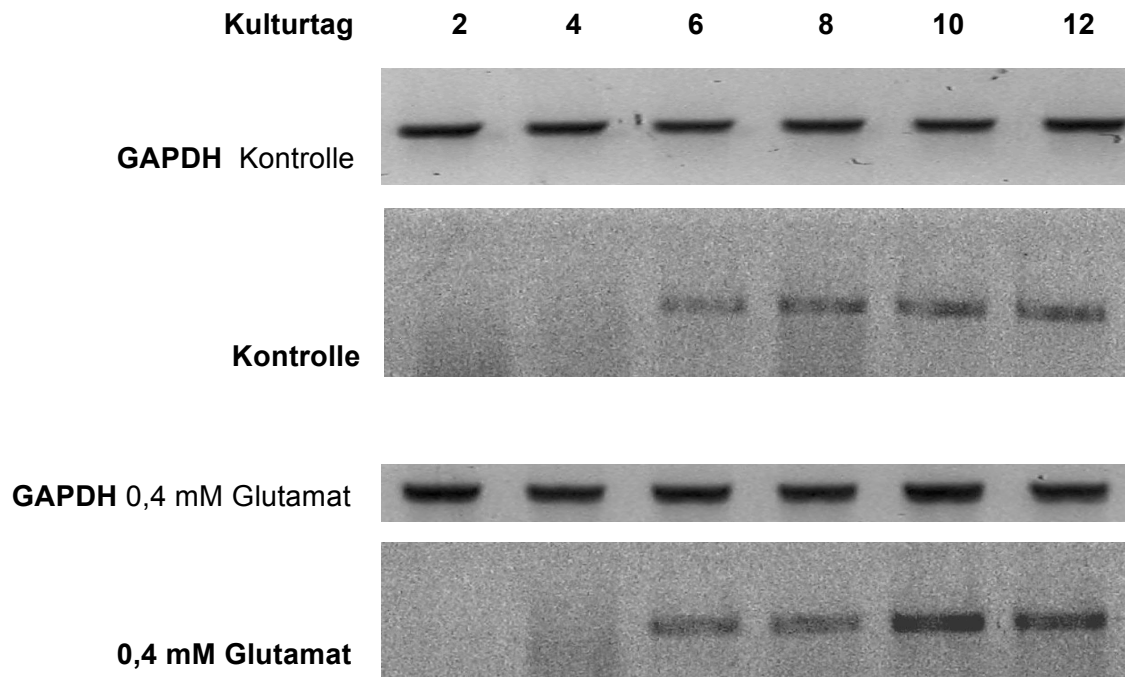


Abbildung 61: Temporale Expression von Stäbchenrhodopsin und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12.

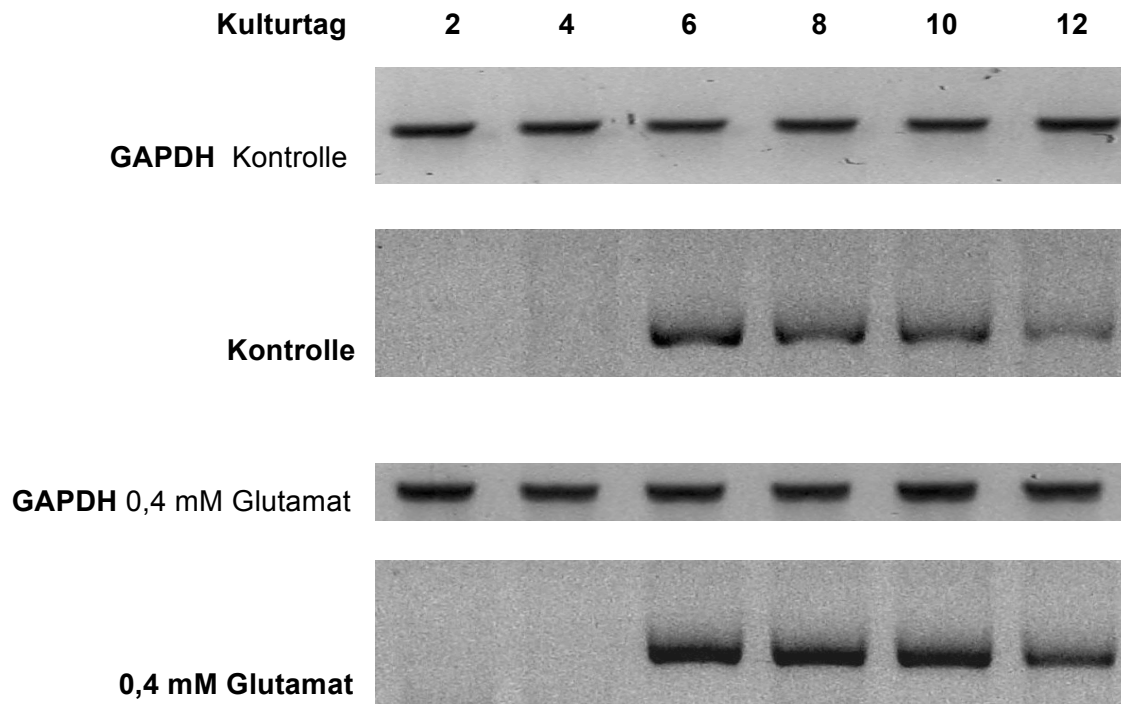
Rotes Opsin

Abbildung 62: Temporale Expression des roten Opsins der Zapfen und GAPDH mRNA an den Kulturtagen 2, 4, 6, 8, 10 und 12.

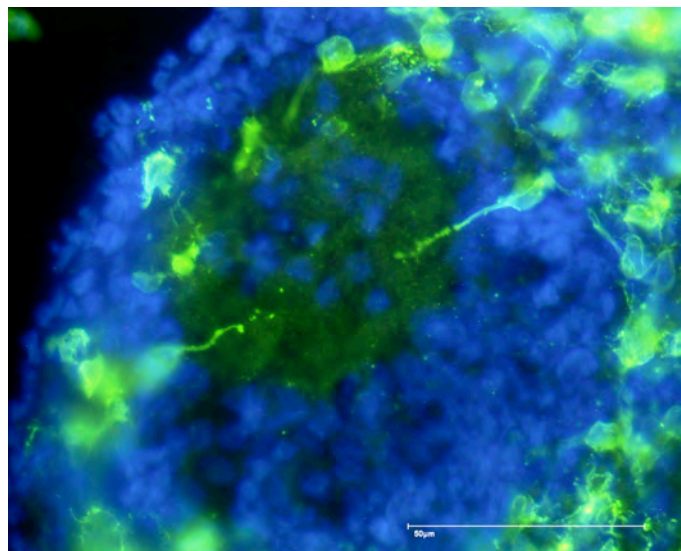
In den 0,4 mM Glutamat behandelten Rosettensphäroidkulturen zeigt sich sowohl eine erhöhte Rhodopsin mRNA-Expression als auch eine erhöhte mRNA-Expression für das rote Opsin (Abb. 61, 62). Die mRNA ist für beide erst ab Kulturtag 6 nachweisbar. Bei der Rhodopsin-Expression für die Stäbchen zeigen die Agarosegele mit den amplifizierten PCR-Produkten in den Kontrollen von Kulturtag 6 bis 12 einen leichteren Anstieg in der Expression. In den Glutamat-behandelten Proben ist die mRNA-Expression an Kulturtag 6 und 8 im Vergleich zu den Kontrollen leicht erhöht und an Tag 10 und 12 stark erhöht (Abb. 61).

Bei den Zapfen ist die Expression der mRNA des roten Opsins sehr stark erhöht im Gegensatz zu der mRNA Expression der Kontrollen. Schon an Kulturtag 6 sind die amplifizierten PCR Produkte deutlich erhöht. Diese Zunahme bleibt gleichermaßen erhöht bis an Kulturtag 12 (Abb. 62). Die Expressionsbanden der roten Opsine sind stärker und breiter wie die des Rhodopsins, da in den Rosettensphäroiden mehr Zapfen als Stäbchenvorhanden sind.

4.2.8.2 Das vorübergehende ‚Targeting‘ der Photorezeptoren in die IPL ist durch die Glutamatbehandlung gestört.

Die Photorezeptoren projizieren mit ihren Fortsätzen in die inneren plexiformen Bereiche (Punkt 4.2.8 Abb. 52 C,E F, Abb. 63). Dort kontaktieren sie die Zellen im Inneren der IPL und ihre Fortsätze verzweigen sich dort teilweise auf Subbandenebenen (s.Abb.52 C). Wie schon von Reese et al. 2001 an der Frettschen Retina beschrieben, projizieren die Photorezeptoren vorübergehend in der Entwicklung der Retina in die IPL, vor der Differenzierung ihrer äußeren Segmente. An der Frettschenretina konnte gezeigt werden, dass durch eine Ablation der cholinergen Amakrinzellen mit Glutamat das ‚Targeting‘ der Photorezeptoren in die IPL gestört ist. Das gezielte Auswachsen von Photorezeptorenfortsätzen auf spezifische Ebenen in der IPL scheint von den Fortsätzen der cholinergen Amakrinzellen abzuhängen.

Abbildung 63: ‚Targeting‘ von Photorezeptorfortsätzen in Richtung der zentralen IPL-Zellen im Rosettensphäroid.
(rho 4D2: grün, Stäbchen) (DAPI: blau) Maßstab: 50 µm.



Auch bei der Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden zeigte sich eine starke Reduktion der cholinergen Amakrinzellen, jedoch keine vollständige Ablation oder Entfernen dieser Zellpopulation bei den hier verwendeten Glutamatkonzentrationen (Punkt 4.2.5). Dadurch ist die Stratifizierung der IPL-Bereiche gestört oder gar nicht vorhanden. Zusätzlich fehlen in den runden Rosettensphäroid-IPL-Bereichen meist die charakteristischen zentralen Zellen, die von den Photorezeptoren kontaktiert werden.

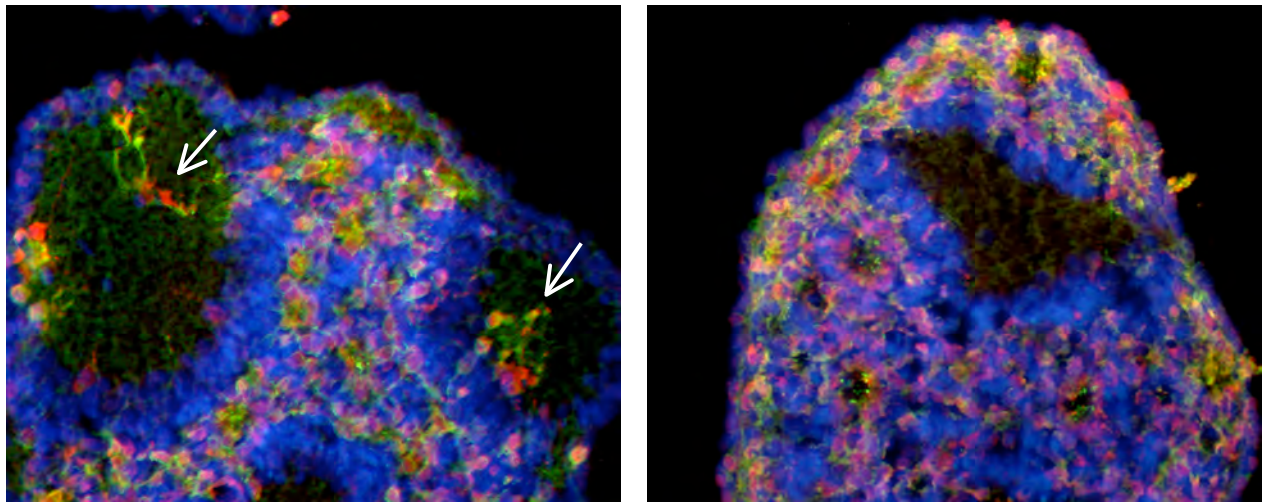


Abbildung 64: Fehlende Fortsätze der Photorezeptorenvorläufer und differenzierter Photorezeptoren (Zapfen) in Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden. K8: Doppel-färbung: Cern 906 grün (Zapfen), Visinin rot (Photorezeptorvorläufer). Links: Kontrolle (Pfeile: Photorezeptoren mit Fortsätzen in IPL). Rechts: 0,4mM (IPL ohne Fortsätze).

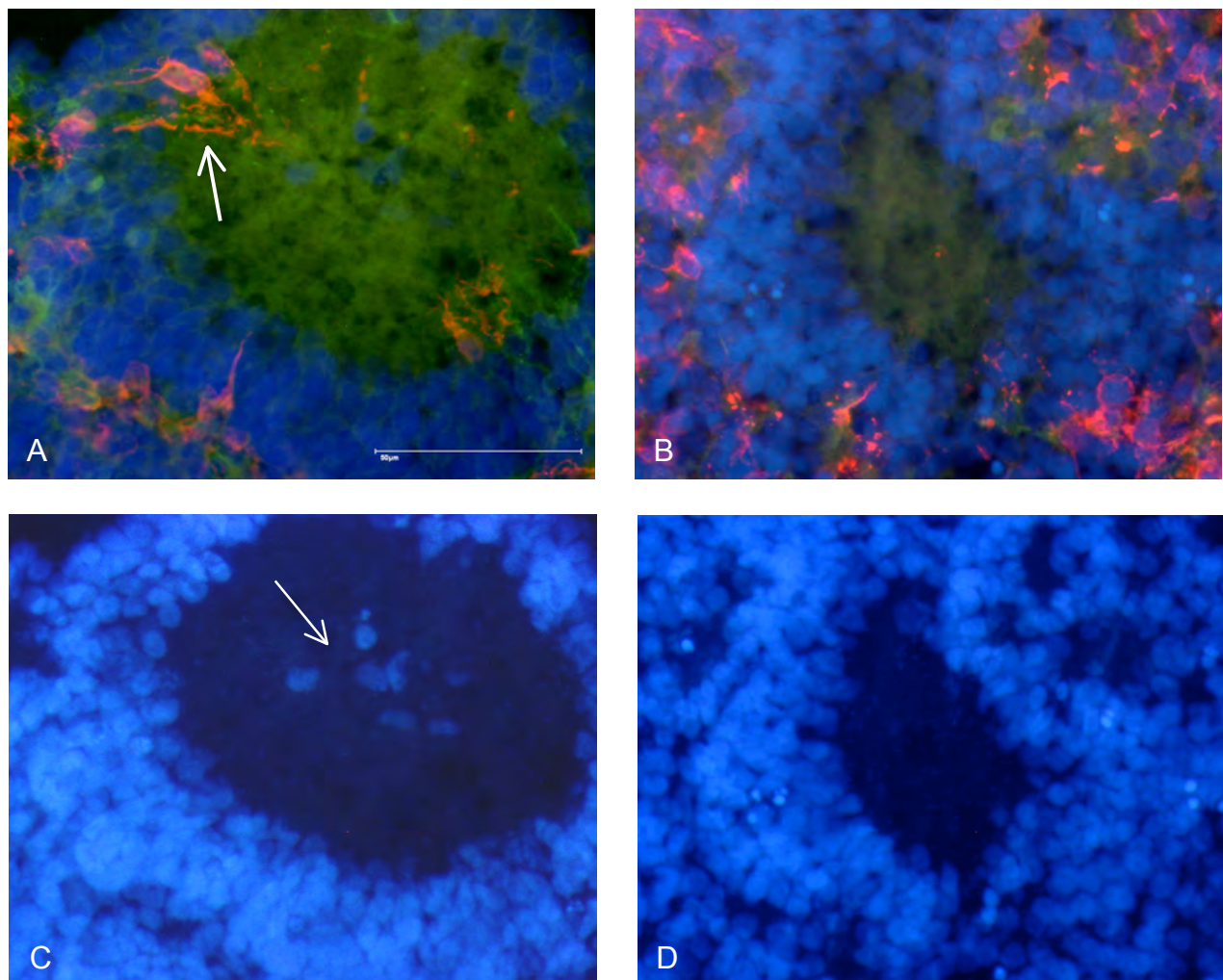


Abbildung 65: Projektionen der Photorezeptoren an K8 in die IPL von unbehandelten Rosettensphäroiden und das Fehlen dieser in Glutamat-behandelten Sphäroiden.

A: Kontrolle, IPL: Fortsätze der Photorezeptoren in die IPL (Pfeil), B: 0,4mM Glutamat, IPL: Nach Glutamatbehandlung Fortsätze fehlend. C: DAPI, Kontrolle (A) IPL. Pfeil: innere IPL-Zellen. D: DAPI, 0,4mM Glutamat (B) IPL.

Doppelfärbung: rot, rho 4D2 = Stäbchen / grün, Cern 906 = Zapfen. Maßstab: 50 µm.

4.2.9 NMDA - Behandlung der Rosettensphäroide

Um zu klären, über welchen Rezeptor im Rosettensphäroidsystem das Glutamat wirkt, wurden in einem zusätzlichen Versuch die Rosettensphäroide mit dem spezifischen Agonisten N-methyl-D-aspartat behandelt. Es sollte dann ein ähnliches oder gleiches Resultat wie bei der Glutamatbehandlung erzielt werden, um den Wirkmechanismus über den NMDA-Kanal zu bestätigen. Die NMDA-Behandlung erfolgte parallel zu einer Glutamatbehandlung mit derselben Endkonzentration von 0,4 mM in 2 ml Aggregationsmedium.

Schon im laufenden Versuch zeigte sich bei den ‚*whole mounts*‘ ein den glutamatbehandelten Rosettensphäroiden äußerlich gleiches Erscheinungsbild. Die plexiformen Bereiche, die sich charakteristischerweise an Kulturtag 6 bis 8 in den Kontrollen stark nach außen vorwölben, waren auch bei NMDA behandelten Rosettensphäroiden verschwunden (Abb. 66). Auch in der Doppelfärbung mit Pax 6 für die Amakrinzellen der INL und Cern 901 für die Stäbchen der ONL bestätigte sich das erste Ergebnis der ‚*whole mounts*‘. Bei den NMDA behandelten Sphäroiden ist die Anordnung der Amakrinzellen in der INL aufgelöst, die IPL Bereiche sind stark reduziert und das Verhältnis der INL-Zellen zu den ONL-Zellen (hier: Stäbchen) verschiebt sich zugunsten der Photorezeptoren. Auch die Karnovsky Reaktion zeigt bei den NMDA behandelten Sphäroiden dieselbe AChE-Reduktion wie in den Glutamat-behandelten Rosettensphäroiden (Abb. 67).

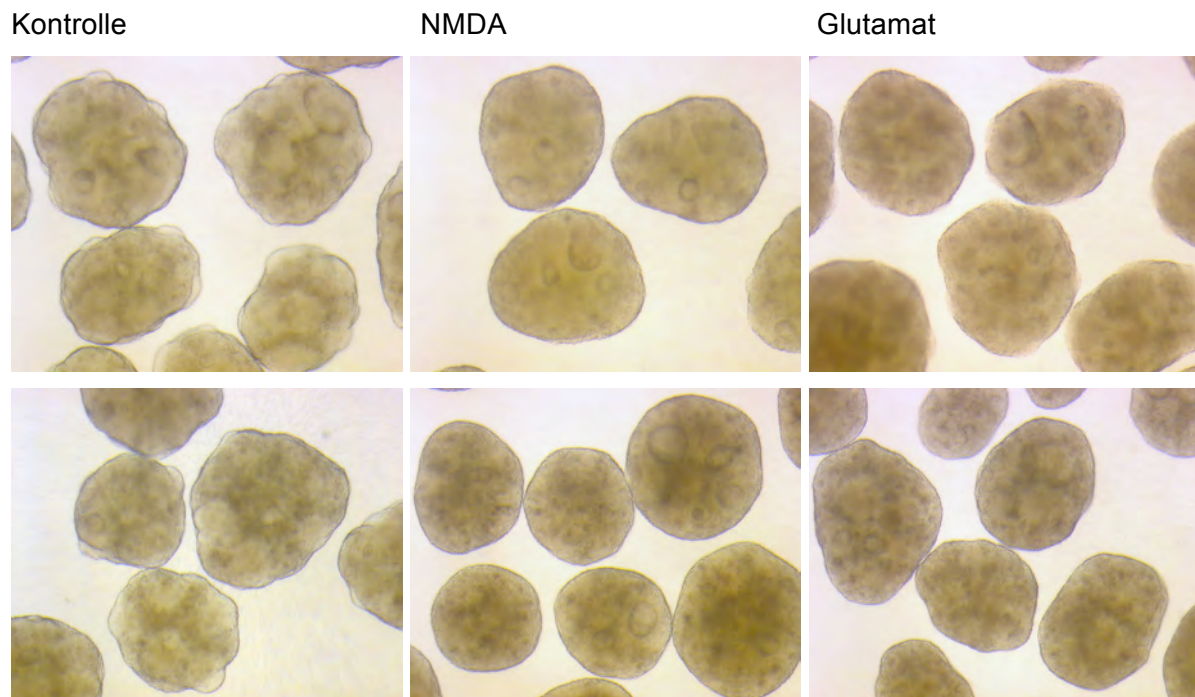


Abbildung 66: ‚Whole mounts‘ der NMDA - und Glutamat - behandelten Rosettensphäroide gleichen sich. Oben: K6, unten: K8. Links: Kontrollen. Mitte: NMDA-behandelt. Rechts: Glutamat-behandelt.

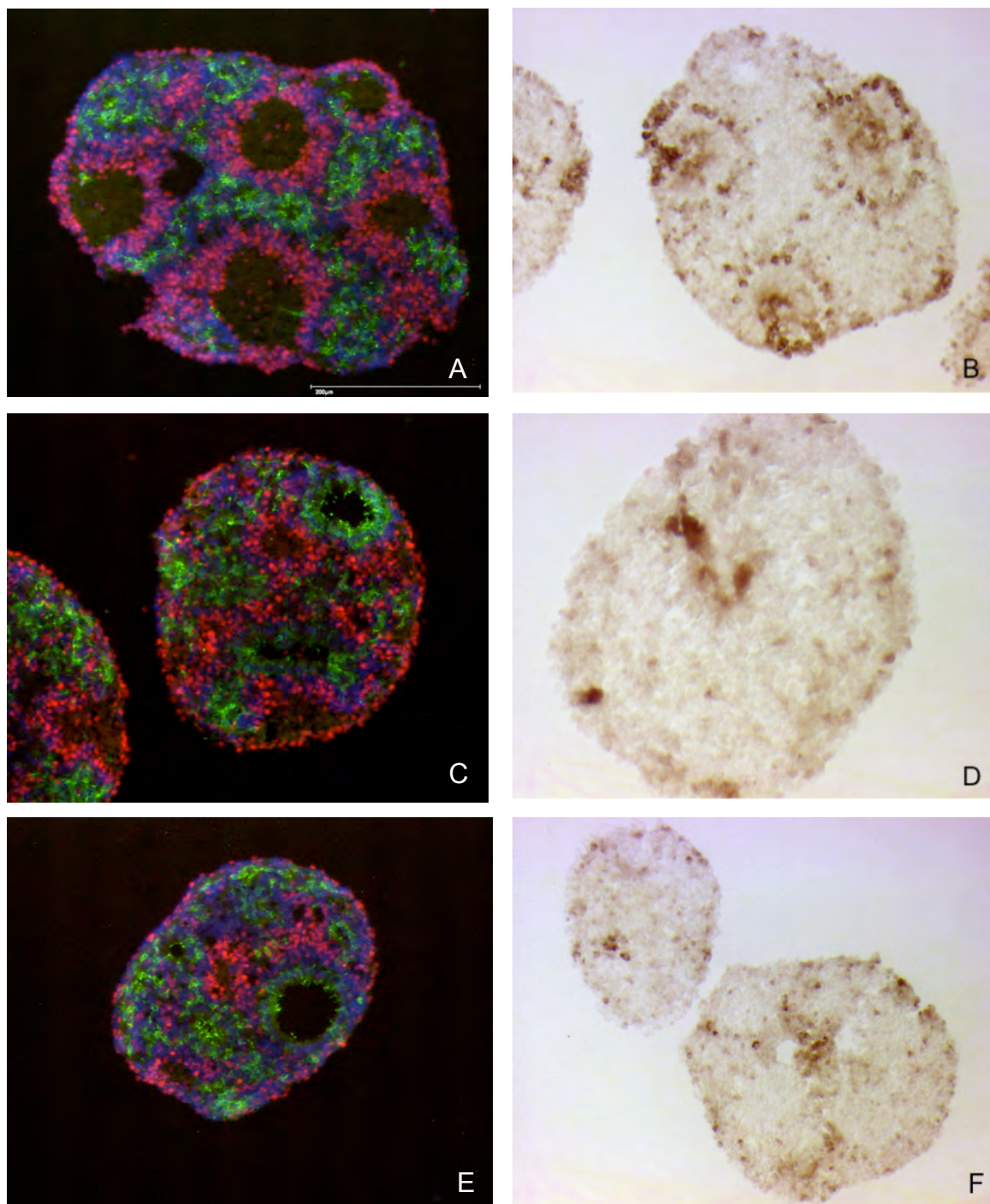


Abbildung 67: NMDA-Wirkung gleicht histologisch der Glutamatwirkung bei Rosettensphäroiden. Kulturtag 8. Links: Pax-6 (rot), Cern 901 (grün), Rechts: Karnovsky. Kontrollen: A und B. NMDA behandelte Rosettensphäroide: C und D. Glutamat behandelte Rosettensphäroide: E und F. Maßstab: 200 μm .

4.2.10 Glutamatrezeptoren: Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801

Um die Ergebnisse der NMDA-Behandlung hinsichtlich des NMDA-Rezeptors zu bestätigen, wurden spezifische Antagonisten eingesetzt. Ein für den ionotropen NMDA-Rezeptor spezifischer Antagonist ist das Dizocilpine (oder MK 801) (Olney et al. 1987). MK-801 bindet innen im Ionen-Kanal des Rezeptors und verhindert den Calcium-Einstrom und dadurch die Depolarisation. Durch seine hohe Spezifität ist er schon in geringen Konzentrationen ausreichend wirksam. MK 801 wurde eingehend untersucht in Bezug auf die Behandlung von Krankheiten mit exzitotoxischen Komponenten, wie zum Beispiel Hirnschlag, traumatischen Hirnverletzungen und neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer und Huntington. Des Weiteren zeigt MK 801 Schutzwirkung bei Neuronen in Zellkulturen mit exzitotoxischer Neurodegeneration. (Ayala & Tapia 2005, Kocaeli et al. 2005, Mukhin et al. 1997).

Im Versuch war MK 801 in einer 100 nM Endkonzentration zusätzlich zu einer 0,4 mM Glutamatendkonzentration im Aggregationsmedium, und wurde alle zwei Tage mit dem Mediumwechsel erneuert.

Beim Vergleich der mit MK 801 und Glutaminsäure-behandelten Rosettensphäroide mit den Kontrollen konnte schon bei den ‚whole mounts‘ kein Unterschied in der äußeren Morphologie festgestellt werden. Die charakteristischen IPL-Ausbeulungen an Kulturtag 6 waren nicht reduziert wie unter der Glutamatbehandlung. Kontrollen und die NMDA-blockierten Sphäroide glichen sich in der Kulturschale in ihrem äußeren Erscheinungsbild (Abb. 68).

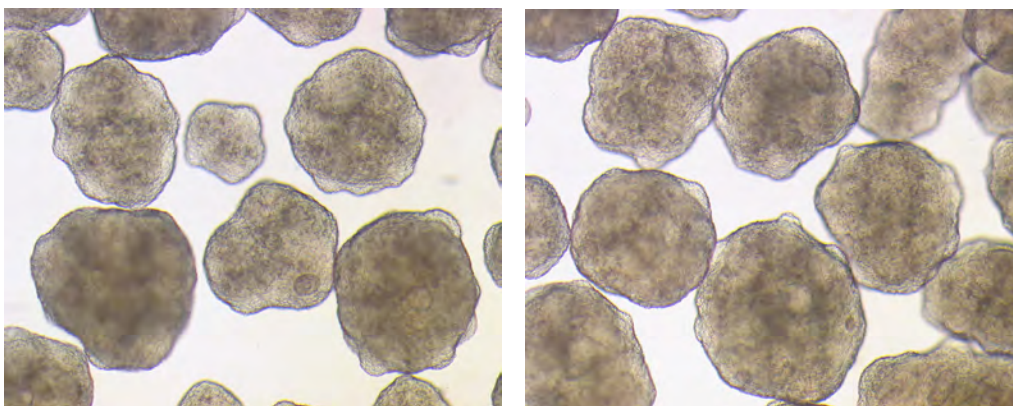


Abbildung 68: ‚Whole mounts‘ der MK 801 behandelten Sphäroide gleichen den Kontrollen. K6 Kontrolle (links) und MK 801 (100 nM) plus Glutaminsäure (0,4 mM) (rechts).

Um das in den ‚whole mounts‘ beschriebene Ergebnis histologisch zu überprüfen, wurden Übersichtsfärbungen an Kryostatschnitten angefertigt. Für die Amakrinzellen der INL eine Pax-6 Antikörperfärbung kombiniert mit einer Cern 901 Antikörperfärbung für die Photore-

zeptoren der ONL. Die Müllergliazellen wurden mit dem Glutaminsynthetase Antikörper markiert und die AChE-Aktivität wurde mit der Karnovsky-Reaktion nachgewiesen (Abb. 69).

Kontrolle

0,4 mM G.S. plus MK 801 (100 nM)

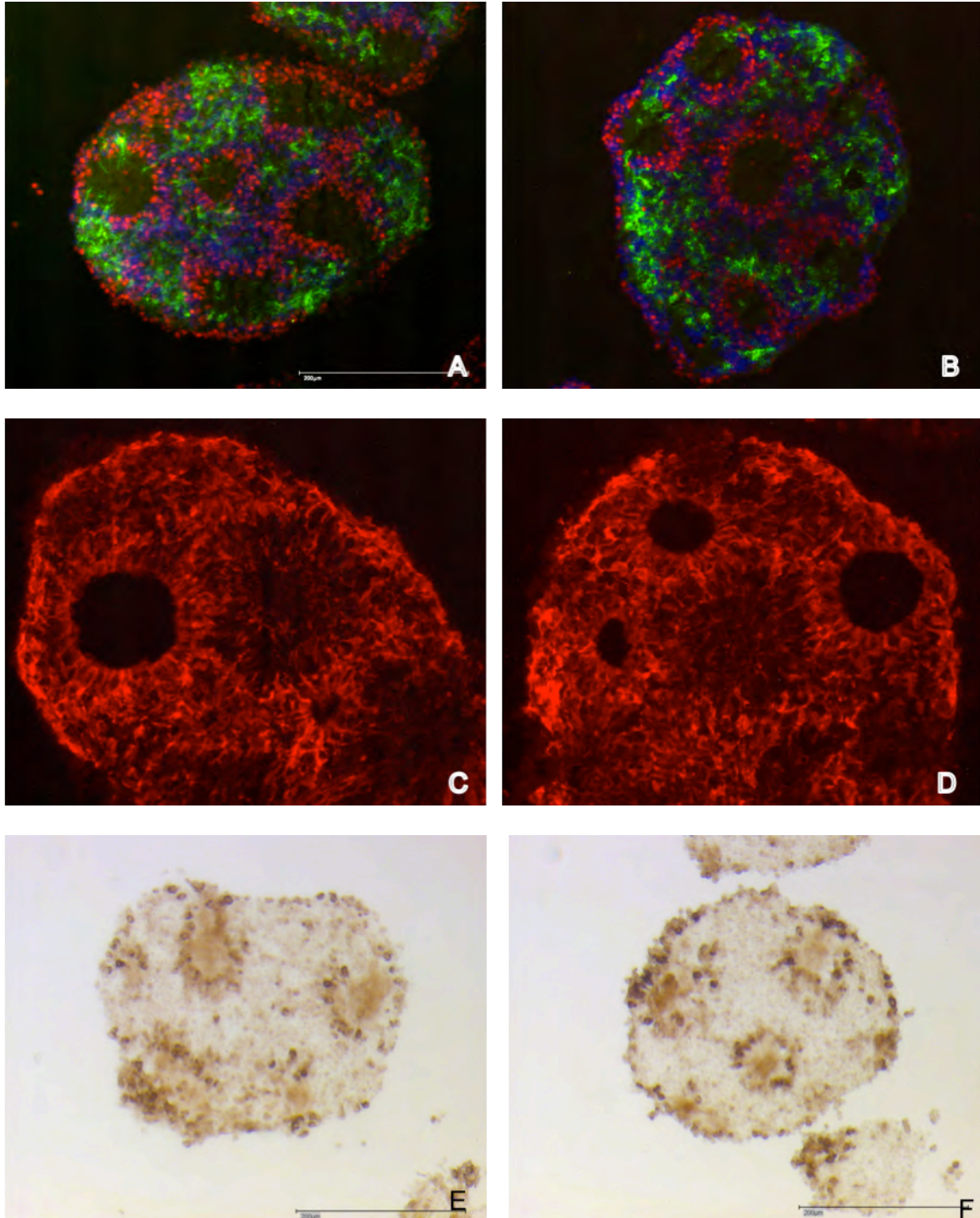


Abbildung 69: Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801 verhindert Wirkung des Glutamats. K6 , Kontrollen links, MK 801 plus 0,4 mM Glutaminsäure rechts. Obere Reihe: (A) Pax-6 (rot: Amakrinzellen / INL); (B) Cern 901 (grün: Stäbchen / ONL). Mittlere Reihe: (C) (D) Glutaminsynthetase (Müllerglia), Untere Reihe: (E) (F) Karnovsky (AChE).

In der Doppelfärbung Pax-6 und Cern 901 zeigen sich in den mit MK 801 und Glutamat behandelten Rosettensphäroiden, sowohl bei den Amakrinzellen der INL als auch bei den Stäbchen der ONL, keine mengenmäßige Veränderungen wie bei der Glutamatbehandlung. Auch die Anordnung der Amakrinzellen in der INL ist nicht gestört. Die IPL-Flächen im Sphäroid sind nicht reduziert (Abb. 69 A und 69 B).

Bei der Markierung der differenzierten Müllergliazellen mit Glutaminsynthetase ist bei den mit MK 801 und Glutamat behandelten Sphäroiden das Gliaskelett ebenso differenziert ausgebildet wie in den Kontrollen. Die Müllergliazellen besitzen ihre typischen, langen Fortsätze (Abb. 69 C und 69 D). Auch beim Vergleich der AChE-Aktivität zwischen den Kontrollen und den NMDA-geblockten Sphäroiden ist kein Unterschied erkennbar, weder in der Aktivitätsmenge noch in der Anordnung der durch Karnovsky/Roots-Nachweis markierten Zellen um die IPL (Abb. 69 E und 69 F). Diese Ergebnisse zeigen, dass hier eine wirksame Blockierung des NMDA-Rezeptors stattgefunden hat. Das Glutamat kann hier im Rosettensphäroidsystern nicht mehr wirken. Die 100 nM Konzentration des NMDA-Rezeptor Blockers war ausreichend.

5. Diskussion

5.1 Verschiedene ‚cell lineages‘ sind verantwortlich für die unterschiedlichen Rosettensphäroidtypen aus verschieden alter embryonaler Retina

Die bei der Herstellung von Rosettensphäroiden immer wieder auffallenden zwei Richtungen unterschiedlicher Rosettensphäroidtypen, führte zur Frage nach der Steuerbarkeit der Rosettensphäroid-Präparation und deren Ursache. Einerseits gab es immer wieder Präparationen aus denen rosettenreiche Sphäroide mit großen Rosetten hervorgingen, und andererseits entstanden Sphäroide mit mehr plexiformen Bereichen und kleineren Rosetten. Da es von großer Bedeutung ist, in welcher Region die Behandlung in den Rosettensphäroiden ansetzen soll, ist es entscheidend, den gewünschten Rosettensphäroidtyp durch eine gesteuerte und definierte Präparation zu erhalten. Diese Präparationsbedingungen und deren Ursachen wurden im ersten Teil dieser Arbeit geklärt.

Ausgehend von einem fast vollständigem Entfernen der cholinergen Amakrinzellen durch Glutamat und deren fehlenden Stratifizierungen in IPL, war es wichtig plexiform-dominante Rosettensphäroide in einer standardisierten Präparation zu erhalten, um die Bedeutung dieser Zellen für die IPL-Bildung zu untersuchen. So wurde als Basis für die spätere Glutamatbehandlung mit spezieller Betrachtung der inneren plexiformen Schicht, im ersten Teil dieser Arbeit nach den Präparationsbedingungen für plexiform-dominante Rosettensphäroide gesucht.

Bei der Präparation von Rosettensphäroiden aus jüngerer Retina (5 bis 5 ½ Tage alter Retina, Hamburger/Hamilton Stadium 26 und 27) waren insgesamt weniger und kleinere Rosetten vorhanden. Dadurch ist die Menge der ausdifferenzierten Photorezeptoren in den Rosetten geringer als in den rosettenreichen Sphäroidtypen. Sie besitzen jedoch große, lang im Sphäroid außenstehende innere plexiforme Schichten (IPL-Beulen). Diese werden im Inneren durch die Fortsätze der INL-Zellen und deren Stratifizierungen charakterisiert.

In Rosettensphäroiden aus Retina 6 Tage alter Embryonen (Hamburger/Hamilton Stadium 29) war sowohl die Anzahl der Rosetten erhöht, als auch deren Größe. Zum Teil war eine einzige große Rosette im Sphäroid zu beobachten. Die IPL-Bereiche der Rosettensphäroide aus 6 Tage alter Retina traten in Anzahl- und Flächenmenge hinter die der Rosetten zurück. Sie blieben nur einen kürzeren Zeitraum im Sphäroid als Beulen außenstehend (s. 4.1.1)

In allen Bereichen der embryonalen Hühnerretina sind die Ganglienzellen an Embryonaltag 2 die Ersten, die den Zellzyklus verlassen und die Bipolarzellen an Embryonaltag 10 die Letzten (Prada et al. 1991). Nach den Ganglienzellen, die hier im Rosettensphäroidsystem nicht lange überleben entstehen *in vivo* an E3 oder E4 die Zapfen gefolgt von den Amakrinzellen

und den Horizontalzellen an E4 bis E4 ½. Die Stäbchen werden an E5 bis E7 geboren und gehören mit den Müllerzellen an E8-9 und den Bipolarzellen an E10 zu den spät geborenen Zellen in der Retina (s. Abb.1, Martins & Pearson 2008). Die IPL bildet sich beim Huhn, indem die Fortsätze der Ganglienzellen und der Amakrinzellen auswachsen und an E9 Synapsen bilden. Die Stratifizierung der IPL beginnt auch zu diesem Zeitpunkt (Drenhaus et al. 2003).

Die Tatsache, dass die multipotenten Progenitorzellen zu den verschiedenen retinalen Zelltypen in einer charakteristischen ‚Geburtsordnung‘ führen, bedeutet, dass Proliferation und Zell-Zyklusaustritt präzise in der Retinaentwicklung geregelt sein müssen (Martins & Pearson 2008). Ein Modell für die Determination des Zellschicksals in der Wirbeltierretina beruht auf der Vorstellung, dass die mitotischen Zellen in der Retina ihre Kompetenz während der Entwicklung verändern. Sowohl die intrinsischen Eigenschaften als auch die extrinsischen Signale lenken die Wahl des Zellschicksals (Cepko et al. 1996).

So sind die Unterschiede zwischen den hier ‚jungen‘ (E5 Retina) Rosettensphäroiden und den ‚alten‘ (E6 Retina) Rosettensphäroiden darauf zurückzuführen, dass zum Zeitpunkt der Präparation in der embryonalen Retina ein spezifischer Zelltyp primär aus dem Zellzyklus austritt. Im Fall der fünf Tage alten Retina sind das primär die Zellen der inneren nukleären Schicht (Amakrinzellen). Damit verbunden ist die Bildung der inneren plexiformen Schicht. Bei der sechs Tage alten Retina dagegen sind es primär die Photorezeptoren (Stäbchen), die aus dem Zellzyklus austreten, die IPL-Bildung durch die Zellfortsätze der INL-Zellen tritt dagegen in den Hintergrund. Die ersten Zellen die sich in der Rotationskultur zusammenlagernden sind Photorezeptoren. Sie bilden Rosetten aus, an deren Peripherie sich im Kulturverlauf weitere Zellen anlagern (Ben Shaul & Moscana 1975). Je mehr Photorezeptoren in Kultur vorhanden sind, desto mehr Rosetten können sich bilden. Diese vermehrten und größeren Rosetten in den Sphäroiden aus der älteren Retina, scheinen aus noch nicht erklärbaren Umständen zu einem frühen Zeitpunkt der Kultivierung teilweise zu fusionieren. Daraus entstehen dann die großen Rosetten, in seltenen Fällen eine einzige große Rosette. Die Anzahl der proliferierenden Zellen, sowie der noch nicht determinierten Zellen ist in der Retina des Entwicklungsstadiums E5 (HH 26/27) höher als in der Retina des Entwicklungsstadiums E6. Dagegen sind in der älteren Retina E6 (HH 29) mehr Zellen, die aus dem Zellzyklus ausgetreten und differenziert sind. So ist die Menge der ausdifferenzierten Photorezeptoren in den Rosettensphäroiden aus der älteren Retina höher. Somit ist in der Präparation mit der E5 Retina eine andere Zelllinie vorherrschend, als in der Präparation mit E6 Retina. Eine weitere Erklärung für den Zelllinien-‚Shift‘ ist die Tatsache, dass während der Präparation die embryonale Retina komplett vereinzelt wird und anschließend die reaggregierenden Zellen in einem *in-vitro* System ca. 14 Tage kultiviert werden. Dadurch können sogenannte extrinsische Faktoren wirken, und eine Zelllinien-Verschiebung verursachen (Cepko et al. 1996,

Adler 2000). Ergebnisse hinsichtlich der Differenzierung, als Antwort auf Signale aus der Umgebung, sind beispielsweise aus früheren Experimenten in Bezug auf Ganglienzellen aus embryonaler Hühnerretina bekannt (Austin et al. 1995, Cepko et al. 1996). Hier konnte in *in-vitro* Experimenten gezeigt werden, dass in Kulturen mit allen Zellen eines Embryonalalters (sowohl Progenitor- als auch alle postmitotischen differenzierenden Zellen) die Antwort auf eine Umgebung mit geringer Zelldichte, mit den Signalen, die von außen kommen, zusammenhängt. *In-vitro* konnte eine signifikante Überproduktion von Zellen beobachtet werden, die Ganglienzellen Antigene exprimieren, im Gegensatz zu der *in-vivo* Situation. *In-vivo* exprimierten höchstens 17 % der Zellen diese Marker. Diese Überproduktion *in-vitro* korrelierte umgekehrt mit der Dichte der Zellen, was darauf hindeutet, dass Kontakt-Inhibition die Produktion von Zellen kontrolliert, die diese Marker produzieren. Alternativ dazu sind die unterschiedlichen Antworten der Progenitorzellen verschiedenen Alters mit den intrinsischen Unterschieden der Progenitorzellen in Zusammenhang zu bringen (Cepko et al. 1996). Deshalb sind für eine Glutamatbehandlung E5-Rosettensphäroide besser geeignet, da die innere plexiforme Schicht hier im *in-vitro* System zeitlich wie auch räumlich dominant ist.

Zusätzlich zu den größeren Rosetten der 6 Tage alten Rosettensphäroide fällt hier die gut ausgebildete Horizontalzellschicht auf. Sie liegt direkt an der Grenze zur OPL und ihre Zellen sind Calretinin positiv. Durch die größeren, dominanten Rosetten sind bei den Sphäroiden aus älterer Retina die Horizontalzellen nur hier zu so charakteristisch zu erkennen. Zu klären wäre, woher die Horizontalzellen hier stammen. Entwickeln sie sich in der sich bildenden INL, oder entstehen sie aus Neuronen der ONL. In der ONL können bei den E6 Rosettensphäroiden bis Kulturtag 5 oder 6 Calretinin-positive Signale nachgewiesen werden. Anschließend erscheinen die Calretinin-positiven Signale in der Horizontalschicht. Somit ist es auch möglich, dass Zellen in der frühen ONL auswandern und die Horizontalzellschicht im Rosettensphäroid bilden (s. 4.1.2 Abb. 20, 22 und Abb. 70).

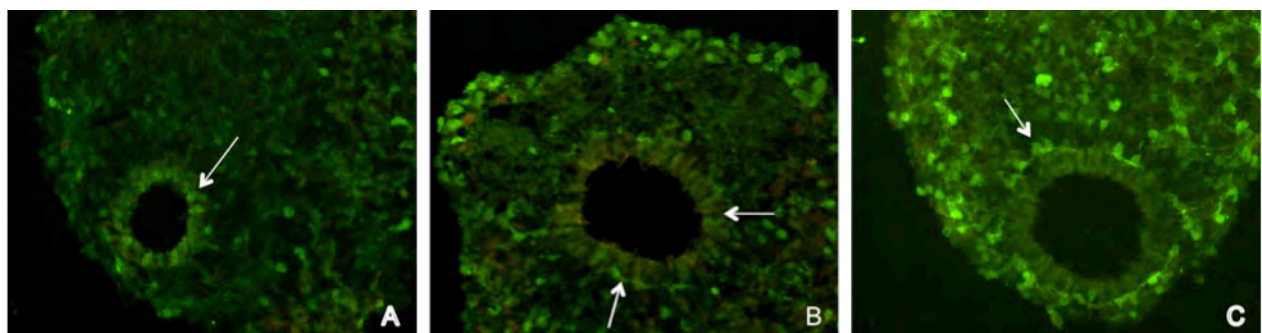


Abbildung 70: E6-Retina-Rosettensphäroide: Entwicklung der Horizontalzellschicht in Rosettensphäroiden.

A: Calretinin-Signale in der ONL (Pfeil) an Kulturtag 4.

B: Calretinin-Signale in der ONL an Kulturtag 6 nur noch sehr schwach und starke Signale in der entstehenden Horizontalzellschicht (Pfeile).

C: Calretinin-Signale an Kulturtag 8 nur noch in der Horizontalzellschicht (Pfeil).

5.2 Neurotoxizität von Glutamat

Die erste Beschreibung der Glutamatneurotoxizität wurde von Lucas und Newhouse (1957) in einem Report vorgelegt, nach dem die Neuronen der inneren Retinaschichten nach subkutaner Gabe von Glutamat in neugeborenen Mäusen rapide degenerieren. Jüngere Forschungen an verschiedenen Spezies bestätigen einerseits die Ergebnisse der Mausretina und zeigen zusätzlich die zerstörende Wirkung des Glutamats auch auf Neuronen in der Gehirnentwicklung (Olney 1982, Choi 1988, Wang & Qin 2010). Exzessive Stimulation von Glutamatrezeptoren führt zu Neurotoxizität, ein Prozess der als Excitotoxizität definiert wurde.

Es gibt zwei postulierte Wirkungsmechanismen für Glutamat. Zum einen die exzitatorische Hypothese, die annimmt, dass pathologische Veränderungen in der dendrosomalen Membranpermeabilität sekundär zu anhaltender Plasmamembran-Depolarisation führen und eine solche Veränderung bedingt den darauffolgenden Prozess der Neuronen-Nekrose (Olney 1978, 1982). Basierend auf Forschungen mit Hühner-Retinae in Kultur postulierten Casper et al. (1982a, b) und Hyndman & Adler (1981) als Alternative zur exzitatorischen Hypothese, dass die Glutamat-Neurotoxizität eine sekundäre Manifestation einer primär toxischen Aktion von Glutamat auf Müllerzellen darstellt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde diese neurotoxische Wirkung des Glutamats im standardisierten dreidimensionalen *in-vitro* Rosettensphäroidsystem untersucht und bestätigt. Dieses *in-vitro* System stellt eine Weiterentwicklung der zweidimensionalen Monolayerkulturen dar. Die Rosettensphäroide sind ein etabliertes Modellsystem, in dem Abläufe der *in-vivo* Retinaentwicklung unter konstanten Kulturbedingungen rekapituliert werden (Layer & Rothhermel 2001). So eignet sich das Sphäroidsystem im besonderen Maße die schon bekannten Eigenschaften des Glutamats unter standardisierten Bedingungen im dreidimensionalen Gewebeverband zu untersuchen.

5.3 Teilweises Entfernen (Ablation) der cholinergen Amakrinzellpopulation in der INL

Reese et al. 2001 konnten an der Frettschen Retina zeigen, dass speziell die cholinergen Amakrinzellen durch L-Glutamat vollständig entfernt wurden. Dadurch entstand in der sich entwickelnden IPL keine Stratifizierung durch deren Fortsätze. Trotzdem entstanden hier *in-vivo* in der Mehrheit die anderen Stratifizierungen, welche die IPL normalerweise charakterisieren. Überraschend war jedoch nach der Ablation der cholinergen Amakrinzellen der Effekt auf die vorübergehende Stratifikation der Photorezeptoren in die IPL. Diese transiente Projektionen der Photorezeptoren waren fehlend oder bis in die Ganglienzellschicht fehlgeleitet

(Reese et al. 2001, Reese 2004), s. auch Abschnitt 5.7.1. Die cholinergen Amakrinzellen sind in der Retina präsent (E4), bevor die meisten anderen Zelltypen der Retina differenzieren. Sie spielen deshalb eine wichtige Rolle für das Festlegen der Tiefe der Stratifikation in der IPL für andere retinale Zelltypen.

In der vorliegenden Arbeit konnte an den Rosettensphäroiden durch eine L-Glutamat-Behandlung mit den verwendeten Konzentrationen ein teilweises Entfernen oder eine deutliche Verminderung der cholinergen Amakrinzellen nachgewiesen werden (s. 4.2.5). Die ChAT-Antikörperfärbung bestätigte einerseits das teilweise Entfernen der cholinergen Amakrinzellpopulation (und somit die *in-vivo* Ergebnisse von Reese et al. 2001 an der Frettschenretina) und andererseits charakterisierte es auch die inneren IPL-Zellen (IPL-Zentralzellen) (Abb.71) als eine Subpopulation cholinergischer Amakrinzellen. Durch die entfernten cholinergen Amakrinzellen war die Stratifizierung der IPL deutlich reduziert oder fehlend, und somit auch die Anzahl der IPL-Zentralzellen reduziert. Die IPL-Entwicklung wurde gestört, die IPL-Bereiche blieben klein, oder fehlten vollständig. Das bedeutet, dass in der Entwicklung der Rosettensphäroide die Population der cholinergen Amakrinzellen früh durch Glutamat mengenmäßig dezimiert und dadurch die räumliche Entwicklung der IPL-Bereiche nachhaltig gestört wird. Das Verhältnis der inneren IPL-Zellen, die zum Teil auch ChAT-positiv sind, zu den ChAT-positiven cholinergen Amakrinzellen der inneren nukleären Schicht, ist verändert, und wirkt sich dadurch am Ende auf die gesamte IPL/INL-Architektur im Rosettensphäroid aus.

Die drastische Reduzierung der cholinergen Amakrinzellpopulation durch L-Glutamat in Rosettensphäroiden aus der Hühnerretina hebt die große Bedeutung dieses Zelltyps für die Entstehung der plexiformen Bereiche hervor. Die daraus resultierende reduzierte cholinerge Stratifizierung bedingt eine veränderte Verschaltung der verschiedenen retinalen Zelltypen in den kleineren IPL-Bereichen und dadurch auch eine andere Entwicklung des Sphäroids mit verändertem Zellverhältnis der übrigen retinalen Zelltypen.

Es stellt sich die Frage, warum durch die Glutamatbehandlung hauptsächlich die cholinerge Amakrinzellpopulation entfernt wurde, wie von Reese et al. (2001) an der Frettschenretina gezeigt. Außer den cholinergen Amakrinzellen waren beim Frettschen auch die Ganglienzellen und eine Klasse der Bipolarzellen in geringerem Ausmaß betroffen. Hier wird angenommen, dass all die betroffenen Zellklassen ionotrope Glutamatrezeptoren besitzen, und dass durch deren Aktivierung ein exzessiver Calcium-Influx verursacht wird, der dann zur Übererregung führt. Die nicht beeinträchtigten Zelltypen besitzen entweder diesen Rezeptor nicht oder benötigen eine weitaus höhere Reizschwelle, um diesen exzitotoxische Effekt zu erzielen.

Wie in den Ergebnissen dargestellt, sind auch in den Rosettensphäroiden die cholinergen Amakrinzellen nicht die einzigen retinalen Zellen der INL, die mengenmäßig durch die Glutamat-Behandlung drastisch reduziert wurden. Die gesamten INL-Zellmenge wird in den Rosettensphäroiden deutlich reduziert (s. Abschnitt 4.2.6 und 5.5).

Eliminiert man im Gegensatz zu den cholinergen Amakrinzellen die Ganglienzellen in der Fretchenretina indem man den optischen Nerv durchtrennt, bleiben die Stratifikationsmuster der inneren plexiformen Schicht intakt (Williams et al. 2001). Dies zeigt sich auch bei den Rosettensphäroiden, wo die Ganglienzellen durch die Durchtrennung des optischen Nervs nach der Präparation absterben. In den nicht behandelten Proben ist die Entwicklung und Ausbildung IPL-Stratifizierung nicht gestört und die IPL zeigt eine normale Größe (Tiefe), sowie sämtliche Subbanden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die cholinergen Amakrinzellen eine sehr wichtige Rolle bei der IPL-Bildung im Sphäroidsystem spielen, da mit ihrer mengenmäßigen Reduktion durch Glutamat auch parallel die IPL-Fläche im Rosettensphäroid stark reduziert wird. Dies kommt auch in der fehlenden Stratifizierung der IPL durch die cholinergen Amakrinzellen im Rosettensphäroid zum Ausdruck. Da aber bei Glutamatbehandlung auch weitere Zelltypen der inneren Retina mengenmäßig reduziert werden fokussiert sich die Bedeutung der cholinergen Amakrinzellen in der IPL-Entwicklung mehr auf die korrekte Verknüpfung der Zellfortsätze in der IPL. Auch die inneren cholinergen Amakrinzellen in den IPLs des Rosettensphäroids fehlen nach der Glutamatbehandlung und sind so nicht mehr Ziel der Photorezeptorenfortsätze (s. 5.7.1). Dadurch scheint der Informationsfluss für eine normale Entwicklung gestört und die Photorezeptormenge in den unorganisierten Bereichen nimmt nach der Glutamatbehandlung zu. So ist es möglich, dass es hier mit durch die fehlenden Stratifizierungen der cholinergen Amakrinzellen zu einer Lineage-Verschiebung hin zu den Neuronen der äußeren Retina, den Photorezeptoren, kommt (s. 5.7).

Weitere Zelltypen oder Mechanismen die an der IPL-Bildung und deren Stratifizierung beteiligt sind, sind zusätzlich von Bedeutung für die korrekte Entwicklung der IPL. So sind beispielsweise die langen Fortsätze der Müllergliazellen und das daraus resultierende Müllergliaskelett auch für eine normale IPL-Entwicklung erforderlich (s.5.6). Parallel zur ausbleibenden cholinergen Stratifizierung der IPL fehlen dann auch die langen Müllergliafortsätze in den IPL-Bereichen. Somit ist die korrekte Stratifizierung der IPL durch die cholinergen Amakrinzellen von grundlegender Bedeutung für die Entwicklung der Retina und dem richtigen Mengenverhältnis der einzelnen retinalen Zelltypen.

5.3.1 Innere IPL- Zellen und cholinerge Amakrinzellsubpopulation: Charakterisierung der zentralen IPL- Zellen im Rosettensphäroid

Aus den aufgezeigten Ergebnissen ergibt sich die Frage nach der Klassifizierung der inneren Zellen in den runden plexiformen Bereichen. Da diese inneren Zellen leicht Pax-6 positiv sind, ist klar, dass es sich hier um einen Amakrinzelltyp handelt (Belecky-Adams et al. 1997). Für die weitere Spezifizierung des Amakrinzellsubtyps konnte mit Hilfe des ChAT-Antikörpers gezeigt werden, dass es sich hier um cholinerge Amakrinzellen handelt (s. 4.2.5.1). Es ist zusätzlich anzunehmen, dass diese in die plexiformen Bereiche ausgelagerten Zellen, den ‚displaced amacrine cells‘ der *in-vivo* Retina entsprechen (s. 1.1.3). Sie exprimieren sowohl ChAT als auch Islet-1 und werden so auch als cholinerges Amakrinzelltyp Typ II bezeichnet (Stanke et al. 2008).

An der *in-vivo* Retina des Huhns konnte auch durch Prada et al. (1999) gezeigt werden, dass die cholinergen Amakrinzellen von einer gemeinsamen postmitotischen Zellpopulation abstammen und sowohl ChAT als auch GABA immunreaktiv sind.

Im Rosettensphäroid sind jedoch mehr innere Zellen in der IPL ChAT positiv als GABA positiv. Die cholinergen Amakrinzellen Typ I sitzen am inneren Rand der INL. Beide Typen werden deutlich durch die Glutamatbehandlung reduziert. Die inneren ChAT-positiven IPL-Zellen fehlen bei der höheren Glutamatkonzentration meist vollständig. Die dezimierende Wirkung des Glutamats auf die cholinergen Amakrinzellen im Rosettensphäroid unterstützt hier die Charakterisierung dieser zentralen IPL-Zellen.

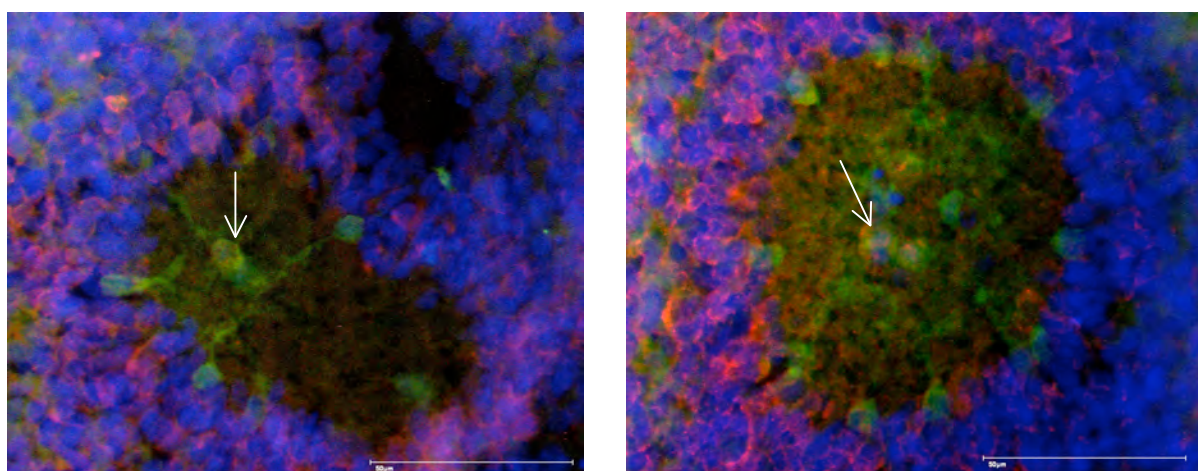


Abbildung 71: Cholinerge Amakrinzellen in der IPL (Typ II) und am Rand der INL (Typ I). Pfeile: ChAT- und GABA-positive innere IPL-Zellen. Links: K4, Rechts: K6, (Nicht behandelte Proben). ChAT (grün), GABA (rot).

5.4 AChE-Aktivität wird durch Glutamat stark reduziert

Durch die deutliche Reduzierung der cholinergen Amakrinzellpopulation mit L-Glutamat in den Rosettensphäroiden war auch eine reduzierte AChE-Aktivität zu vermuten. Diese stark verringerte AChE-Aktivität wurde durch eine Karnovsky/Roots-Reaktion und durch einen Ellman-Assay bestätigt. Fast sämtliche AChE exprimierenden Amakrinzellen in der INL sind verschwunden.

Das bedeutet einerseits, dass Neuronen mit dem Neurotransmitter Acetylcholin größtenteils ‚ausgenockt‘ sind und dadurch die prozentuale Zusammensetzung der INL-Neuronen verändert ist. Andererseits ist, bedingt durch die zusätzliche Eigenschaft des Acetylcholins, die Differenzierung im Rosettensphäroidsystems gestört.

Das Enzym Acetylcholinesterase assoziiert man zunächst meist mit Neurotransmitterfunktionen cholinerg Synapsen im adulten Organismus. Im Gegensatz zu dieser schon länger bekannten ‚spezifischen‘ Cholinesterase bei der Reizübermittlung gibt es auch die ‚unspezifische‘ Funktionen der Cholinesterase wie die embryonale Cholinesterase. Das Enzym bestimmt hier die Differenzierung des embryonalen Gewebes zu entwickelten Organen wesentlich mit. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die embryonale ChE-Aktivität während morphogenetischen Bewegungen im Gewebe auftritt (Drews 1975).

Jede Organanlage durchläuft während ihrer Entwicklung eine Phase von ChE-Aktivität. Anhand der histochemischen ChE-Reaktion konnte gezeigt werden, dass diese embryonale ChE-Aktivität meist in einem frühen, begrenzten Stadium (Kulturtag 4 bis Kulturtag 8) der Rosettensphäroidentwicklung erscheint und nach der Differenzierung in die hier definitive Gewebsstruktur wieder aus den Zellen verschwindet. Da die AChE-Aktivität in den behandelten Rosettensphäroiden ab Kulturtag 6 deutlich reduziert ist, ist der weitere Differenzierungsverlauf im Sphäroid verlangsamt und ab Kulturtag 8 gestoppt. Die normale Entwicklung des Rosettensphäroids wird nicht abgeschlossen. So zeigen sich bei den behandelten Sphäroiden veränderte Zellmorphologien (siehe Müllerglia) und Gewebsstrukturen nach der Gesamtkultivierungsdauer, die einen nicht ausdifferenzierten Zustand widerspiegeln.

5.5 Stark reduzierte IPL- und INL-Bereiche im Rosettensphäroid durch Glutamat

Die in Kapitel 4.2 dargestellten Ergebnisse belegen die neurotoxische Wirkung des Glutamats, indem die INL-Bereiche der Rosettensphäroide in ihrem Aufbau gestört und deren Neurone mengenmäßig drastisch reduziert sind. Dadurch ist auch die damit zusammenhängende Bildung der plexiformen Bereiche im Rosettensphäroid gestört und deren Subbandenbildung unterbleibt. Übersichtsfärbungen für die Amakrinzellen der INL mit dem Antikörper gegen Pax-6 zeigen die Abnahme der Amakrinzellen-Gesamtmenge und die Auflösung des INL-Aufbaus (siehe Kapitel 4.2).

So lässt sich auch am *in-vitro* Rosettensphäroidsystem die primär neurotoxische Wirkung der Glutamatbehandlung nachweisen, wie es schon früher an *in-vivo* Retinae des Huhns (Reif-Lehrer et al. 1975, Romano et al. 1998) gezeigt wurde. Primär wurden hier in der *in-vivo* Retina die Neurone der inneren nukleären Schicht durch die Behandlung mit L-Glutamat geschädigt. Glutamat führte zu Schädigungen an Amakrin-, Horizontal- und Ganglienzellen in der E12 Retina des Huhns und verursachte auch ein Anschwellen der IPL. Diese Schäden waren konzentrations- und zeitabhängig. Bei höheren Glutamat-Konzentrationen und längerer Inkubationszeit wurden auch in manchen Photorezeptoren morphologische Veränderungen festgestellt. Die verwendeten Glutamatkonzentrationen (0,3mM bis 2,4mM) dieser *in-vivo* Retinae-Versuche lagen zumindest in den niedrigsten Konzentrationen im gleichen Bereich wie die hier im Rosettensphäroidsystem verwendeten (s. 3.2.2). Mit den in dieser Arbeit verwendeten zwei Glutamat-Hauptkonzentrationen von 0,2mM und 0,4mM liegt man im Anfangsbereich der Glutamatbehandlungen von retinaler Gewebe. So ist zu erklären, dass die Rosettensphäroide zwar bezüglich ihrer INL und IPL neurotoxisch geschädigt und verändert sind, sie aber andererseits in ihrer Gesamtlebensdauer oder Struktur weder eingeschränkt oder nachhaltig gestört sind.

Besonders auffallend sind die stark reduzierten oder fehlenden IPL-Beulen im Rosettensphäroid durch die Glutamatbehandlung. Dies bestätigte die Vermutung, dass die durch Glutamat stark verminderte cholinerge Amakrinzellpopulation und deren fehlenden Fortsätze in die IPL, Auswirkungen auf die IPL-Bildung hat. Die IPL-Bereiche sind, wenn vorhanden, in ihrem Flächenanteil deutlich reduziert und nach innen in den Sphäroid verlagert. Die durch die neurotoxische Wirkung mengenmäßig reduzierten Neurone der INL, senden weniger zielgerichtete Fortsätze in die IPL-Bereiche um dort Subbanden zu bilden. Dadurch unterbleibt eine im Rosettensphäroid dominante Phase der IPL- und Subbandenbildung. Auch die inneren, zentral in der IPL liegenden Zellen sind durch die Neurotoxizität des Glutamats mengenmäßig reduziert. Die in der normalen Rosettensphäroidentwicklung beobachtbare

Projektion von Fortsätzen verschiedener Zelltypen in Richtung dieser Zentralzellen unterbleibt fast vollständig. Somit ist auch in den IPL-Bereichen weniger Platz erforderlich. Der Zeitraum der sichtbaren IPL-Dominanz zwischen Kulturtag 6 und 8 in der normalen Rosettensphäroidentwicklung ist unter Glutamatbehandlung, wenn vorhanden, nur auf Kulturtag 6 begrenzt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die Glutamatbehandlung im Rosettensphäroid *in-vitro* System die große Bedeutung der inneren plexiformen Schicht als Marker für Veränderungen nach Behandlungen hervorgehoben wird. Die IPL-Bereiche reagieren primär auf Manipulationen und zeigen so schon vor den Rosetten die Ergebnisse der Behandlung auf. Die Voraussetzung dafür ist eine hochstandardisierte Herstellung und Kultivierung von Rosettensphäroiden.

5.5.1 Entwicklung der inneren plexiformen Schicht ist durch Glutamatbehandlung gestört: Stratifizierung der IPL fehlt

In der inneren plexiformen Schicht werden, wie schon in Kapitel 1.1.2 beschrieben, die Fortsätze sämtlicher Zelltypen der inneren nukleären Schicht mit den Fortsätzen der Ganglienzellen verschaltet. Durch die horizontale Verschaltung von den Dendriten bestimmter Zelltypen kommt es in der IPL zur Subbandenbildung. Der Ablauf der IPL-Differenzierung ist grundsätzlich mit der Reifung der Amakrinzellen und der Ganglienzellen gekoppelt (Drenhaus et al. 2003).

Die schon in früheren Arbeiten (Reese et al. 2001) gezeigte Wirkung des Glutamats hinsichtlich einer Störung der Subbandenbildung in der IPL diente für diese Arbeit als Grundlage. Die Glutamatbehandlung führt im Rosettensphäroid zu stark reduzierten INL-Bereichen mit deutlich weniger Amakrinzellen. Dadurch entstehen weniger Fortsätze, die in der sich entwickelnden IPL verschaltet werden. Auch das Verhältnis der verschiedenen Amakrinzellsubtypen in der INL ist durch die Glutamatbehandlung gestört. Durch die Axonin-1 Antikörperfärbung wird neben einer Amakrinzell-Subpopulation die Gesamt-Stratifizierung der IPL markiert. Diese kann mit der Axonin-1 Färbung nach der Glutamatbehandlung (mit 0,4 mM) nicht mehr nachgewiesen werden (s. 4.2.4.2, Abb.39). Bei einer niedrigeren Konzentration (0,2 mM) sind noch Ansätze von Stratifizierung in der IPL zu erkennen. Durch die reduzierten Amakrinzellfortsätze wird eine Bildung der inneren plexiformen Schicht und der Subbandenbildung nur eingeschränkt erforderlich. Die IPL-Bereiche bleiben kleiner oder werden mangels Stratifizierung reduziert im Rosettensphäroid entwickelt. Auch Subbanden, gebildet durch die cholinergen Amakrinzellen werden nach der Glutamatbehandlung in den Sphäroiden nicht mehr entwickelt (s. 4.2.5.2). Dies konnte durch eine ChAT/CRABP-

Antikörperfärbung gezeigt werden (Abb.42). Auch die Subbandenbildung anderer Retinazelltypen, wie z.B. der Photorezeptoren ist an die Subbandenbildung der cholinergen Amakrinzellen gekoppelt.

5.5.2 Anzahl der zentralen Zellen in der IPL ist stark reduziert

Die Anzahl der inneren IPL-Zellen (charakterisiert durch ChAT, Islet-1, Pax-6) in den typischen, runden IPL-Bereichen der Rosettensphäroide wird durch die Glutamatbehandlung deutlich reduziert (s. 4.2.4 u. 4.2.6.1). Die mit dem ChAT Antikörper charakterisierten ‚displaced amacrin cells‘ in der Mitte der IPL-Bereiche fehlen. Wenn nach der Glutamatbehandlung noch runde IPL-Bereiche im Rosettensphäroid vorhanden sind ist die Anzahl der inneren Zellen gering. Zum Teil sind auch keine inneren Zellen mehr vorhanden. Dadurch fehlt die Attraktion, die diese Zellen auf Zellen der INL ausüben. Die Projektionen der INL-Zellen und der ONL-Zellen in die Richtung der inneren IPL-Zellen unterbleiben (s. 4.2.8.2). Diese zentralen, inneren Zellen spielen eine wichtige Rolle in der IPL-Entwicklung und ihrer Stratifizierung (Reese 2004). Die Frage nach der Ursache für deren Attraktion konnte noch nicht geklärt werden. Hier eignet sich das standardisierte Rosettensphäroidsystem sehr gut zur Analysierung dieser Attraktions-Signale. Bei diesen noch unbekannten molekularen Signalen könnte es sich um Zytokine, wie z.B. GDNF oder auch PEDF handeln. Sie spielen auch eine wichtige Rolle in der Photorezeptorentwicklung der Retinosphären (Eberhardt 2007). Zusätzlich war es auch in dieser Arbeit wichtig, den Zelltyp in der IPL näher zu charakterisieren (s. auch Punkt 4.2.4.1 und 5.3.1). Da diese inneren IPL-Zellen sowohl Pax-6 als auch Islet-1 positiv sind, handelt es sich hier um spezifische Amakrinzellen, die in Abschnitt 5.3.1 näher spezifiziert werden.

5.6 Fehlendes Müllergliasklett in glutamatbehandelten Rosettensphäroiden

Die Müllergliazellen des Rosettensphäroids zeigen nach der Glutamatbehandlung eine veränderte Morphologie. Ihre Zellkörper sind mehr rund und wirken vergrößert. Das entspricht auch früheren Untersuchungen an *in-vivo* Retinae mit niedrigen Glutamatkonzentrationen (Casper et al. 1982a,b, Romano et al.1998).

Auch ihre typischen Fortsätze sind nach der Glutamatbehandlung stark verkürzt und bilden kein charakteristisches Müllergliasklett im Sphäroid. Besonders die radiären Fortsätze in die

INL-Bereiche fehlen. Trotz der Glutamatbehandlung sind aber die Müllergliazellen mengenmäßig nicht reduziert. Das bedeutet, dass L-Glutamat bei den hier verwendeten Konzentrationen primär neurotoxisch wirkt und nur sekundär durch die reduzierte und veränderte Neuronenzusammensetzung sich auch auf die Morphologie der Gliazellen und das Auswachsen ihrer Fortsätze auswirkt.

Der veränderte Aufbau des Rosettensphäroids mit der reduzierten INL-Bereichen und IPL-Fläche bietet den Gliazellen kaum die Möglichkeit ihre normale Entwicklung auszuführen. Es stellt sich die Frage ob die Müllergliazellen mit der Bildung und Strukturierung der plexiformen Bereiche beginnen, indem ihre Fortsätze die Stratifizierung des IPL-Bereichs vorbereiten, oder ob durch die neurotoxische Wirkung des Glutamats auch die Müllergliazellen nachhaltig durch die drastisch reduzierten Amakrinzellen der INL und deren fehlenden Fortsätze in ihrer Entwicklung gestört sind. Da die Müllergliazellen in der Retinaentwicklung aber erst relativ spät differenzieren (E8/E9) scheint eine primär gliatoxische Wirkung des Glutamats eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Müllergliazellen sekundär durch die Schädigung der Neuronen zur Proliferation angeregt werden und dann eventuell auch Neuronenvorläufer bilden (Fischer 2001) (s. 5.6 und 5.7).

5.7 In den unorganisierten Bereichen der Rosettensphäroide wird die Anzahl der Photorezeptoren durch die Glutamat-Behandlung erhöht.

Ein der neurotoxischen Wirkung des Glutamats entgegengesetztes Ergebnis zeigte sich bei den Photorezeptoren der Rosettensphäroide nach der Behandlung. In den unorganisierten Bereichen der Sphäroide, zwischen den Rosetten und den INL-artigen Bereichen sind nach der Behandlung mit L-Glutamat signifikant mehr Photorezeptoren nachweisbar. Allerdings unterscheiden diese sich morphologisch von den Photorezeptoren in den Rosetten. Sie sind nicht differenziert und verharren dort mit einem eher gedrungenen Zellkörper und sehr kurzen Fortsätzen bis zum Ende der Kultivierung der Sphäroide. Es scheint das Signal oder die Rezeptoren zu fehlen, um auch in die Rosetten einzuwandern und dort sich in ihre typische längliche Zellform mit Ansätzen von äußeren Segmenten zu differenzieren. Die in dieser Behandlung verwendete L-Glutamat Konzentration führt in den Rosettensphäroiden zu keiner Schädigung oder Reduktion der Photorezeptoren-Population.

In der Literatur wurden altersabhängige Effekte des L-Glutamats auf Photorezeptoren in isolierten Hühner Retinae beschrieben (Casper et al.1982). In jünger als zwölf Tage alter Retina

konnte auch bei höheren Glutamatkonzentrationen keine Schädigung festgestellt werden. Jedoch wurden bei älteren Retinae die Photorezeptoren durch Glutamat nachhaltig geschädigt.

Da hier bei der Glutamatbehandlung der Rosettensphäroide auch eine niedrige Glutamatkonzentration angewandt wurde, bestätigt sich das *in-vivo* Ergebnis der Glutamatbehandlung an den Retinae auch *in-vitro* an den Sphäroiden. Zusätzlich ist das Alter der präparierten embryonalen Retinae mit Tag E5 oder E6 im jüngeren Bereich. Das Glutamat hat auf die Photorezeptoren in den Rosetten keine negativen Auswirkungen, sie wandern in die ONL ein und differenzieren dort in charakteristischer Weise. In den Bereichen zwischen den Rosetten und den INL-Bereichen scheint es zu einer Vermehrung der jungen (undifferenzierten) Photorezeptoren zu kommen. Diese unreifen, bipolaren Photorezeptoren projizieren nicht in die hier kleineren IPL-Bereiche (s. 5.6.1). Sie bleiben unreif, was auch die reduzierte AChE-Aktivität erklärt (s. 5.4).

Des Weiteren ist bekannt, dass Vorläuferzellen die aus der embryonalen Retina junger Stadien isoliert wurden *in-vitro* zuerst Photorezeptoren bilden und dann die Neuronendifferenzierung folgt. Das heißt, dass die retinalen Vorläuferzellen nach ihrer letzten Mitose die Fähigkeit behalten sich entweder als Neuronen oder als Photorezeptoren zu entwickeln. Außerdem scheint die Photorezeptoren-Differenzierung einen konstitutiven oder „default-pathway“ zu repräsentieren, dem die Vorläuferzellen in der Abwesenheit von Neuronen-induzierenden Signalen folgen (Adler & Hatlee 1989).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass hier im Rosettensphäroidsystem eine sogenannte ‚lineage‘ Verschiebung weg von der inneren Retina hin zu den Photorezeptoren, (der äußeren Retina) stattfindet.

5.7.1 Transiente Projektionen der Photorezeptoren in die IPL-Bereiche der Rosettensphäroide werden durch Glutamat-Behandlung gestört.

Bei der Betrachtung der Photorezeptorenfortsätze in der Entwicklung der Retina fielen speziell die Projektionen bis in die inneren plexiformen Bereiche auf. In früheren Arbeiten an der Frettschenretina konnte gezeigt werden, dass die Photorezeptorenfortsätze die sich entwickelnde äußere plexiforme Schicht übergehen und ihre Fortsätze bis in die innere plexiforme Schicht verlängern, um sie dann bis in die äußere plexiforme Schicht wieder zurückzuziehen (Johnson et al. 1999). Diese sogenannte ‚transiente Morphologie‘ der Photorezeptoren spielt in der Entwicklung der inneren plexiformen Schicht eine bedeutende Rolle, besonders hinsichtlich der Tatsache, dass deren Fortsätze sich auf eine der beiden Sub-Strata übereinstimmend mit den Fortsätzen der cholinergen Amakrinzellen wiederfinden und die IPL stratifizieren (Reese et al. 2001, Reese 2010). Durch die Ablation der cholinergen Amakrinzellpopulation mit L-Glutamat konnte auch an der Retina des Frettschens gezeigt werden, dass das sog. ‚transiente photoreceptor-targeting‘ in die IPL gestört wurde (Johnson et al. 2001).

Auch in den Rosettensphäroiden sind diese vorübergehenden Projektionen der Photorezeptoren in die IPL-Bereiche zu beobachten. Die Amakrinzellenzellen in den INL- Bereichen sind für die ‚transienten‘ Photorezeptoren, sowohl für die Stäbchen als auch für die Zapfen, attraktiv. Diese Photorezeptoren projizieren in ihre Richtung, um Informationen für ihre weitere Differenzierung zu erhalten. Des Weiteren stehen sie in Verbindung mit den differenzierten Photorezeptoren der Rosetten, die sich dort in der ONL angeordnet haben und äußere Segmente entwickeln. Dies konnte anhand spezifischer Antikörperfärbungen für Stäbchen und Zapfen mit zusätzlicher Markierung der zentralen IPL-Zellen gezeigt werden (s. Abbildung 65 und 72).

Nach der L-Glutamat Behandlung der Rosettensphäroide sind diese vorübergehenden oder transienten Projektionen der Photorezeptoren in die noch verbliebenen, reduzierten IPL-Bereiche hier auch fast vollständig fehlend. Es ist zu vermuten, dass durch die mangelhafte oder fehlende Stratifizierung der verbleibenden IPL-Bereiche und den fehlenden zentralen IPL-Zellen in den behandelten Sphäroiden für die Neuronen in den unstrukturierten, reduzierten intermediären Bereichen, eine Rückmeldung oder Information über die fortschreitende Differenzierung des Rosettensphäroidaufbaus fehlt. Dadurch bleiben die noch dort vorhandenen Photorezeptoren undifferenziert (Visinin-positiv) und eine Vermehrung dieser wird durch den unterbrochenen Kontakt zwischen INL und IPL in den anschließenden intermediären Bereichen ermöglicht oder ausgelöst. Außerdem verharren diese unreifen Photorezeptoren in den intermediären Bereichen und wandern nicht in die Rosetten ein. Diese vermittelnde Rolle der unreifen Stäbchen und Zapfen fällt in den L-Glutamat behandelten Rosettensphäroiden weg. Die fehlenden Signale der inneren IPL-Zellen führen entweder zu einem

Zellshift innerhalb der intermediären Bereiche oder zu einer Proliferation der noch vorhandenen kleinen, unreifen Photorezeptorpopulation. Durch die gestörten Signalwege innerhalb des Sphäroids wird sozusagen ein Alternativprogramm oder Rettungsprogramm für den Rosettensphäroid eingeleitet. Die normale Entwicklung ist unterbrochen, die Photorezeptorenentwicklung ist gestört aber mit diesen Glutamatkonzentrationen nicht irreversibel geschädigt. Das führt zur Entstehung von vielen neuen Photorezeptorenvorläufern in den noch unstrukturierten, intermediären Bereichen.

Diese Ergebnisse weisen auf die vielseitigen Wirkungen des Glutamats hin. Einerseits die toxische Wirkung auf die Zellen der inneren Retina und andererseits die proliferationsfördernde Wirkung auf die Neuronen der äußeren Retina, wie hier am Beispiel der Photorezeptoren gezeigt. So sind die hier gezeigten Ergebnisse auch von großer Bedeutung für die medizinische Forschung.

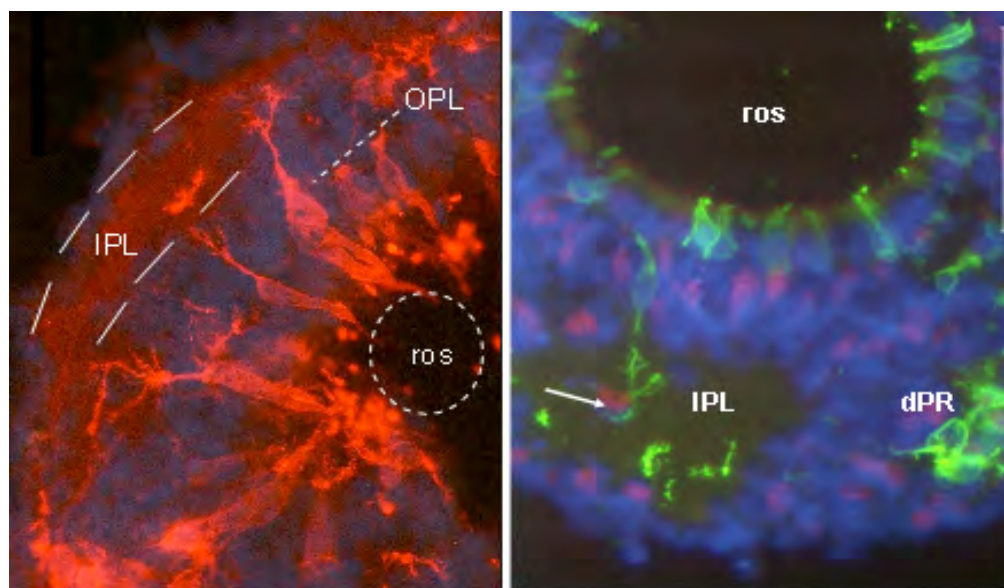


Abbildung 72: ‚Transiente‘ Fortsätze der Photorezeptoren (Stäbchen) in Rosettensphäroiden. Stäbchen links: rot, CERN901, rechts: grün, rho4D2, Maßstab (rechts, oben): 100 μ m. Kulturtag 13 (ros: Rosette, dPR: diffuse photoreceptor, IPL: inner plexiform layer, OPL: outer plexiform layer).

Links: Unreife Photorezeptoren bilden äußere Segmente in den Rosetten und senden Fortsätze auf definierte Ebenen der IPL. Außerdem auch Photorezeptoren mit Projektionen nur zur zukünftigen OPL (oben rechts).

Rechts: Diffuse Photorezeptoren aus den intermediären Bereichen wandern in IPL Nähe, sind einerseits in Kontakt mit den inneren IPL-Zellen (Pfeil) (rot: Islet-1) und andererseits in Kontakt mit den Photorezeptoren der Rosetten.

5.7.2 Retinosphäroide als 3D- *in vitro*-Modellsystem zur Untersuchung der Plastizität von Photorezeptoren in ihrer Entwicklung.

Die Retinosphären eignen sich somit sehr gut um die Photorezeptorenplastizität *in-vitro* zu untersuchen, insbesondere ihre Fortsatzbildung in die IPL und ihre finale Reifung bzw. ihr Absterben. Die Rosettensphäroide sind geeignete Modelle, um die noch unbekannten molekularen Signale der inneren IPL-Zellen zu analysieren, welche eine starke Attraktion auf die Fortsätze der Photorezeptoren ausüben. Es ist wichtig, mehr über die Differenzierung und das Überleben der Photorezeptoren zu erfahren um beispielsweise die Ursachen vieler Erblindungskrankheiten zu verstehen. In der Retina von *Retinitis pigmentosa* Patienten wurde entdeckt, dass es überlebende Photorezeptoren gibt, die lange Fortsätze in die plexiforme Schicht senden, um dort Synapsen zu bilden (Fariss et al. 2000). Dies kann auch als eine Form von Rettungsprogramm verstanden werden, bei dem die noch lebenden Photorezeptoren nach Signalen suchen, die zur Rettung des Systems dienen.

Vielleicht werden in den Retinosphären Prozesse wieder in Gang gesetzt, die während der normalen Retinaentwicklung verborgen bleiben und primär *in-vivo* keine dominante Rolle spielen. Indem man dieses standardisierte 3D- *in-vitro* Modellsystem der Rosettensphäroide benutzt, kann man diese verborgenen Prozesse der Retinaentwicklung gezielt beobachten und untersuchen. Im Besonderen ist durch die Behandlung der Rosettensphäroide (hier durch L-Glutamat) die Bedeutung von Entwicklungsschritten im Differenzierungsprozess besser darzustellen und zu verstehen.

So besitzen die Retinosphäroide, hier speziell die Rosettensphäroide, ein ein großes Potential durch gezielte Behandlungen versteckte Prozesse in der Entwicklung freizulegen und diese für die Grundlagenforschung oder für die medizinische Forschung zu nutzen.

5.8 Erhöhte Proliferation von Zellen in den unorganisierten Bereichen

Ein weiteres wichtiges Resultat der Glutamatbehandlung von Sphäroiden ist die signifikante Erhöhung der Proliferation von Retinazellen zu einem relativ späten Zeitpunkt in der Rosettensphäroidentwicklung. Dies ist besonders in den unorganisierten, intermediären Bereichen festzustellen. Dort sind auch die zusätzlichen Photorezeptorenvorläufer nach Behandlung mit Glutamat zu beobachten (s. 5.6). Daher ist anzunehmen, dass aus den durch die Proliferation zusätzlich entstandenen Neuronen hauptsächlich Photorezeptorenvorläufer gebildet werden. Die Wirkung des Glutamats manifestiert sich im Rosettensphäroidsystem erst nach fünf Kulturtagen was auch die für Rosettensphäroide späte Erhöhung der Proliferation erklärt (Kulturtag 6 und 8). In den Rosettensphäroiden beginnen dann die Zellen, ausgelöst durch die Glutamatbehandlung, in den unorganisierten Bereichen wieder in die Proliferationsphase einzutreten.

Es ist bekannt, dass die Müllerglia der Retina nach Verletzungen wieder in die Proliferationsphase eintreten kann und dann sowohl Gliazellen als auch Neuronen bildet (Fischer 2001). So besteht hier auch die Möglichkeit, dass durch die Glutamatbehandlung der Rosettensphäroide eine chemische Reizung oder Verletzung der Müllergliazellen ausgelöst wird. Dadurch treten dann diese wieder in die Proliferationsphase ein und bilden unter anderem Neuronen, hier unreife Photorezeptoren.

Unter bestimmten Bedingungen können ebenso reife, differenzierte Neuronen wie zum Beispiel Horizontalzellen wieder in den Zellzyklus eintreten und proliferieren (Davis & Dyer 2010). Hier wird angenommen, dass es dafür zelltypische, spezifische Barrieren für den Wiedereintritt von differenzierten Neuronen in den Zellzyklus gibt. Dieses Verständnis für den Wiedereintritt postmitotischer Zellen in den Zellzyklus durch verschieden hohe Barrieren ist von medizinischer Bedeutung besonders in der Tumorforschung. Beispielsweise Neuronen, die höhere Barrieren besitzen um wieder in den Zellzyklus einzutreten, werden weniger dazu zu tendieren Tumore zu bilden, sondern eher degenerieren. Im Gegensatz dazu neigen Neuronen mit geringen Barrieren für den Zellzykluswiedereintritt eher zur Tumorbildung und weniger zur Degeneration.

Bei den Rosettensphäroiden kann durch die Glutamatbehandlung nach Davis & Dyer (2010) auch eine spezifische Barriere eines spezifischen Neuronentyps herabgesetzt worden sein, und dadurch treten hier differenzierte reife Neuronen wieder in die Proliferationsphase ein. Sie bilden dann undifferenzierte Photorezeptorenvorläufer die durch Visinin nachweisbar sind.

5.9 Glutamat wirkt hier über den NMDA-Rezeptor

Glutamat ist der Haupt-Neurotransmitter der Photorezeptoren, Bipolarzellen und der Ganglienzellen in der Wirbeltierretina. Neben den metabotropen Glutamatrezeptoren gibt es drei Hauptklassen von ionotropen Glutamatrezeptoren: AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren (s. 1.3.1). Die ionotropen Glutamatrezeptoren sind in der Retina des Huhns in der INL, hier meist in den Amakrinzellen, der Ganglienzellschicht und in ihren Fortsätzen in der IPL verteilt (Bredariol & Hamassaki-Britto 2001).

Bei der Klärung der Frage, über welchen der verschiedenen ionotropen Glutamatrezeptoren hier im *in-vitro* System das L-Glutamat wirkt, zeigte sich, dass durch eine Blockierung des NMDA-Rezeptors mit MK 801 die Glutamatwirkung vollständig verhindert wird. MK 801 ist bekannt durch seinen starken Schutz gegen NMDA-Toxizität (Olney et al. 1987). Die gleichzeitig mit MK 801 und Glutamat behandelten Rosettensphäroide glichen den unbehandelten Proben. Spezifische Rezeptoren-Blocker für weitere Glutamatrezeptoren, wie Kainsäure (Chen et al. 1999) für die Kainat-Rezeptoren oder GYKI 52466 (Zorumski et al. 1993) für die AMPA-Rezeptoren zeigten keine Wirkung. Das bedeutet, dass die Glutamatwirkung hier in den Rosettensphäroiden über den NMDA-Rezeptor vermittelt wird.

Auch Behandlung der Rosettensphäroide mit dem Agonisten NMDA im Vergleich zu L-Glutamat ergaben identische Ergebnisse. Die NMDA-behandelten Sphäroide glichen den Glutamat behandelten. Dies zeigt, dass hier bei der Behandlung der Rosettensphäroide das Glutamat ausschließlich über den NMDA-Rezeptor wirkt. Die Blockierung dieses spezifischen Rezeptors verhindert in der Sphäroidentwicklung die durch Glutamat verursachten charakteristischen Veränderungen der INL und damit einen gestörten IPL- Aufbau.

Es ist bekannt, dass die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren die Proliferationsrate der Vorläuferzellen aus Müllerglia signifikant erhöht (Ramirez & Lamas 2009). Dies bestätigt auch die Proliferationssteigerung in den Rosettensphäroiden nach der Glutamatbehandlung (s. 5.7).

Aus der Literatur sind zusätzlich Schädigungen der *in-vivo* Retina nach NMDA-Behandlungen bekannt (Stanke et al. 2010). Hier wurden durch eine NMDA-Behandlung speziell die Ganglienzellschicht der Hühner-Retina *in-vivo* geschädigt. Allgemein ist bekannt, dass NMDA eine akute Excitotoxizität in den Neuronen der Retina auslöst und zur Schwellung des Gewebes führt. Diese histologischen Verletzungen (Läsionen) oder dieser metabolische Stress, ausgelöst durch NMDA können durch NMDA-Antagonisten, wie den nicht-kompetitiven Antagonist MK 801, verhindert werden (Zeevalk & Nicklas 1990, 1993). Medizinisch betrachtet können Schädigungen der Retina verursacht durch Glutamat, mit MK

801 so verhindert oder gemildert werden. Der primär neurotoxischen Wirkung des Glutamats kann so entgegengewirkt werden. So ist bei einem NMDA-Rezeptor vermittelten zytotoxischen Effekt auf die Neuronen eine Behandlung mit MK 801 möglich.

In der medizinischen Forschung wurden die neuroprotektiven Effekte von MK 801 bei Glaucoma bedingter Ganglienzell-Apoptose *in-vivo* bereits nachgewiesen und können so bei Glaucoma-Patienten ihre Anwendung finden (Guo et al. 2006).

Die hier gezeigten positiven Auswirkungen des Glutamats, wie die erhöhte Proliferation oder das vermehrte Auftreten von Photorezeptoren kommen jedoch bei einer Blockierung des NMDA-Kanals nicht zur Ausbildung. So wäre es von Vorteil bei einer Schädigung des Gewebes oder Zellen durch Glutamat einerseits die toxischen Auswirkungen durch eine speziell angepasste MK 801-Dosierung zu verhindern und andererseits die positiven Effekte des Glutamats medizinisch zu nutzen.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Entwicklung der inneren plexiformen Schicht in der Retinogenese unter spezieller Betrachtung der cholinergen Amakrinzellen zu beschreiben. Dies wurde anhand einer L-Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden untersucht. Als Grundlage diente eine Arbeit mit Glutamat an der Fretchenretina, aus der hervor ging, dass Glutamat cholinerge Amakrinzellen der inneren nukleären Schicht in der Retina entfernt und dadurch die IPL- und INL-Entwicklung nachhaltig verändert. Im Gegensatz zur *in-vivo* Retina sollten hier am standardisiertem 3D-*in-vitro*-Kultursystem die Auswirkungen von L-Glutamats auf die innere nukleäre und innere plexiforme Schicht des Rosettensphäroids dargestellt werden. Neben der primär neurotoxischen Wirkung des Glutamats sollten insbesondere mögliche spezifische Wirkungen des Glutamats in der Retina-Entwicklung untersucht werden.

Rosettensphäroide entwickeln sich abhängig vom Alter der präparierten embryonalen Retina unterschiedlich. Sphäroide aus fünf Tage alter Retina werden von plexiformen Bereichen dominiert und sind länger durch typischen IPL-Ausbeulungen charakterisiert. Dagegen weisen Sphäroide aus sechs Tage alter Retina viele und große Rosetten auf, die IPL-Bereiche sind klein und die Sphäroide runden sich früher ab. Diese Steuerbarkeit der Rosettensphäroid-richtung ist von großer Bedeutung für den Ansatz der späteren Sphäroid-Behandlung. Für die Glutamatbehandlung der Rosettensphäroide und die daraus resultierende spezielle Betrachtung der plexiformen Bereiche erwies sich die Präparation aus fünf Tage alter embryonalen Retina als vorteilhaft. Die durch die Glutaminsäure-Behandlung gezeigten Effekte nehmen mit der Glutaminsäuremenge und Behandlungsdauer zu (bei den hier verwendeten Konzentrationen). Sie verändern mit der eingesetzten Konzentrationsbreite die prozentuale Zusammensetzung der retinalen Neuronen, ohne die Sphäroide nachhaltig zu schädigen. Eine abschließende Differenzierung des Rosettensphäroids findet nicht statt. Makroskopisch sind sie in Kultur ab dem 5./6. Tag zu beobachten, indem die behandelten Sphäroide runder sind und weniger bis gar keine plexiforme Ausbeulungen besitzen. Ihr Kulturmedium mit Glutaminsäure ist weniger verbraucht. Dies bestätigt sich auch mikroskopisch, wobei Differenzierungsunterschiede hier schon ab dem 5. Kulturtag zu beobachten sind.

Die Gabe von Glutaminsäure (L-Glutamat) zum Aggregationsmedium reduziert geordnete innere plexiforme Bereiche (IPL) in den Rosettensphäroiden. Die Gesamtmenge der plexiformen Bereiche nimmt stark ab, oder fehlt fast vollständig. Ebenso werden die inneren nukleären Bereiche (INL) hinsichtlich ihrer Zellmenge und ihrer Struktur deutlich reduziert. Die cholinergen Amakrinzellen werden durch die Glutamatbehandlung größtenteils entfernt. Die verbliebenen cholinergen Amakrinzellen bilden kaum strukturierte Fortsätze aus.

Dadurch entsteht keine charakteristische cholinerge Subbandenbildung in der IPL. Auch eine in den plexiformen Bereichen liegende Zellpopulation, die als ‚Informanten‘ für viele andere retinale Zellen während der Differenzierung dienen könnten, werden in den Glutamat-behandelten Sphäroiden entfernt. Bei diesen Zellen handelt es sich wahrscheinlich zum größten Teil um den cholinergen Amakrinzelltyp II, der auch Islet-1 positiv ist. Die AChE-Aktivität der behandelten Sphäroide ist auffallend reduziert. Mit AChE als Differenzierungsmarker wird der nicht ausdifferenzierte Zustand der behandelten Sphäroide bestätigt. Das Müllergliazellgerüst ist bei behandelten Sphäroiden deutlich verändert. Die Müllerzellfortsätze sind verkürzt und besitzen keine klar geordneten, radiären Strukturen in den inneren plexiformen Bereichen und in den Rosetten. Dadurch entsteht keine für die Rosettensphäroide typisch ausdifferenzierte Gewebe-Strukturierung. Ihre Zellmorphologie ist verändert. Die Zellkörper sind gedrun-gen und abgerundet, ihre Zellfortsätze nur kurz. Die Anzahl der Müllergliazellen ist in den be-handelten und nicht-behandelten Proben gleich. So werden die Zellen der inneren Retina entweder in ihrer Anzahl oder in ihrer morphologischen Ausdifferenzierung reduziert. Die Wir-kung des L-Glutamats ist hier der früheren Literatur entsprechend primär neurotoxisch und nicht gliatoxisch.

Dagegen nehmen die Zellen der äußeren Retina (Photorezeptoren) durch die Glutamatbe-handlung zu. Die neurotoxische Wirkung des Glutamats kann sich hier nicht manifestieren. Es kommt zu einem vermehrten Auftreten von undifferenzierten Photorezeptoren in den unorga-nisierten Bereichen. Die nicht behandelten Proben dagegen weisen im ausdifferenzierten Sphäroid nur noch vereinzelt Photorezeptoren in den unorganisierten Bereichen auf, die an-deren befinden sich ausdifferenziert in den Rosetten. Es findet hier durch die Glutamat-Behandlung eine ‚Lineage‘-Verschiebung hin zu den Photorezeptoren statt, also weg von der inneren Retina. Meine Resultate zeigten ferner eindeutig, dass das L-Glutamat im Sphäroid-system über den NMDA-Rezeptor wirkt. Eine Blockierung des Rezeptors mit MK 801 verhin-dert die Glutamatwirkung; die behandelten Sphäroide gleichen dann den unbehandelten Pro-ben. Das Resultat einer NMDA-Behandlung gleicht dem einer Glutamatbehandlung der Ro-settensphäroide und bestätigt die Wirkung über den NMDA-Rezeptor.

Zusammenfassend verhindert eine durch Glutamat gestörte IPL-Entwicklung einerseits die endgültige Differenzierung des Rosettensphäroids und induziert andererseits die Bildung von neuen Photorezeptoren. Die Bedeutung der cholinergen Amakrinzellen für die Stratifizierung der IPL ist deshalb von großer Bedeutung für die Entwicklung der Retina und der prozentua-len Zusammensetzung ihrer Zelltypen. Dies könnte ein interessanter und wichtiger Ansatz-punkt für medizinische Behandlungen an der Retina sein.

7. Literatur

Adler, R. (2000): A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Progress in retinal and eye research* **19** (5): 529-557.

Adler, R., Hatlee, M. (1989): Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science*. **243**: 391-393.

Adler, R., Raymond, P.A. (2008): Have we achieved a unified model of photoreceptor cell fate specification in vertebrates? *Brain Research* **1192**: 134-150.

Austin, C.P., Feldman, D.E., Ida, J.A., Cepko, C.L. (1995): Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**(11): 3637-50.

Ayala, G.X., Tapia, R. (2005): Late N-methyl-D-aspartate receptor blockade rescues hippocampal neuron from excitotoxic stress and death after 4-aminopyridine-induced epilepsy. *European Journal of Neuroscience* **22**(12): 3067-3076.

Belecky-Adams, T., Cook, B., Adler, R. (1996): Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro. *Developmental Biology* **178**: 304-315.

Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O., Adler, R. (1997): Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Investigative ophthalmology & visual science* **38**(7): 1293-303.

Ben-Shaul, Y., Moscona, A.A. (1975): Scanning electron microscopy of embryonic neural retina cell surfaces. *Developmental Biology* **44** (2): 386-93.

Bredariol, S., Hamassaki-Britto, D. (2001): Ionotropic glutamate receptors during the development of the chick retina. *Journal of Comparative Neurology* **441**(1): 58-70.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Bradford, R.L., Wang, C., Zack, D.J., Adler, R. (2005): Roles of cell intrinsic and microenvironmental factors in photoreceptor cell differentiation. *Developmental Biology* **286**(1): 31-45.

Brazel, C.Y., Nunez, J.L., Yang, Z., Levison, S.W. (2005): Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience* **131**(1): 55-65.

Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, L., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A. (2009): Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International* **54**(3-4): 143-60.

Bruhn, S.L., Cepko, C.L. (1996): Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *The Journal of Neuroscience* **16**(4): 1430-9.

- Bytyqi, A. H., Bachmann, G., Rieke, M., Paraoanu, L.E., Layer, P.G.** (2007): Cell-by-cell reconstruction in reaggregates from neonatal gerbil retina begins from the inner retina and is promoted by retinal pigmented epithelium. *European Journal of Neuroscience* **26**(6): 1560-74.
- Casper, D.S., Trelstad, R.L., Reif-Lehrer, L.** (1982a): Glutamate-induced cellular injury in isolated chick embryo retina: Müller cell localization of initial effects. *Journal of Comparative Neurology* **209**(1): 79-90.
- Casper, D.S., Trelstad, R.L., Reif-Lehrer, L.** (1982b): Age-dependent Effects of Glutamate on Photoreceptor Cells of the isolated chick embryo Retina. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **41**(5): 522-35.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., Ezzeddine, D.** (1996): Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **93**: 589–595.
- Cepko, C.L.** (1999): The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in determination of retinal cell fates. *Current Opinion in Neurobiology* **9**: 37-46.
- Chalupa, L.M., Günhan, E.** (2004): Development of On and off retinal pathways and retinogeniculate projections. *Progress in Retinal and Eye Research* **23**(1): 31-51.
- Chen, Q., Olney, J.W., Price, M.T., Romano, C.** (1999): Biochemical and morphological analysis of non-NMDA receptor mediated excitotoxicity in chick embryo retina. *Visual neuroscience* **16**(1):131-9.
- Choi, D.W.** (1988): Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**: 623-634.
- Davis, D.M., Dyer, M.A.** (2010): Retinal progenitor cells, differentiation, and barriers to cell cycle reentry. *Current Topics in Developmental Biology* **93**: 175-88.
- Drenhaus, U., Morino, P., Veh, R.W.** (2003): On the development of the stratification of the inner plexiform layer of the chick retina. *Journal of Comparative Neurology* **460**(1): 1-12.
- Drenhaus, U., Morino, P., Rager, G.** (2004): Expression of Axonin-1 in developing amacrine cells in the chick retina. *Journal of Comparative Neurology* **468**(4): 496-508.
- Drews, U.** (1975): Cholinesterase in embryonic development. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* **7**(3): 1-52.
- Duarte, C.B., Ferreira, I.L., Santos, P.F., Carvalho, A.L., Agostinho, P.M., Carvalho, A.P.** (1998): Glutamate in life and death of retinal amacrine cells. *General Pharmacology* **30**, 289–295.
- Dyer, M.A., Cepko, C.L.** (2001): Regulating Proliferation during retinal Development. *Nature Reviews Neuroscience* **2**: 333-342.
- Eberhardt, K.** (2007): Die Retinogenese im dreidimensionalen Zellkultursystem des Huhns: Eine zell- und molekularbiologische Studie neurotropher Funktionen der Zytokine GDNF, BDNF und PEDF. *Doktorarbeit*
- Ehrlich, C., Sattayasai, A., Zappia, J., Barrington, M.** (1990): Effects of selective neurotoxins on eye growth in the young chick. *Ciba Foundation Symposium* **155**: 63-84.

- Ellis, J. H., Richards, D.E., Rogers, J., H.** (1991): Calretinin and calbindin in the retina of the developing chick. *Cell and Tissue Research* **264**(2): 197-208.
- Ellman, C.L., Courtney, K.D., Andres, V., Feathstone, R.M.** (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**: 88-95.
- Fan, W., Li, X., Cooper, N.** (2007): CaMKII α B Mediates a Survival Response in Retinal Ganglion Cells Subjected to a Glutamate Stimulus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **48**(8): 3854-3863.
- Fariss, R.N., Li, Z.Y., Milam, A.H.** (2000): Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. *American Journal of Ophthalmology* **129**: 215-223.
- Fischer, A.J., Seltner, R.L., Poon, J. Stell, W.K.** (1998): Immunocytochemical characterization of quisqualic acid- and N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxicity in the retina of chicks. *Journal of Comparative Neurology* **393**(1): 1-15.
- Fischer, A.J., Wallman, J., Mertz, J.R., Stell, W.K.** (1999): Localization of retinoid binding proteins, retinoid receptors, and retinaldehyde dehydrogenase in the chick eye. *Journal of Neurocytology* **28**: 597-609.
- Fischer, A.J.** (2001): Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience* **4**: 247-52.
- Fischer, A.J.** (2005): Neural regeneration in the chick retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. **24**(2): 161-82.
- Fischer, A.J., Dierks, B.D., Reh, T.A.** (2002): Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development* **129**: 2283-2291.
- Fischer, A.J., Reh, T.A.** (2003): Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* ;**43**:70-76.
- Fischer, A.J., Stanke, J.J., Aloisio, G., Hoy, H., Stell, W.K.** (2007): Heterogeneity of Horizontal Cells in the Chicken Retina *Journal of Comparative Neurology* **500**: 1154-1171.
- Fischer, A.J., Foster, S., Scott, M.S., Sherwood, P.** (2008): The transient expression of LIM-domain transcription factors is coincident with the delayed maturation of photoreceptors in the chicken retina. *Journal of Comparative Neurology* **506**: 584-603.
- Frohns, F.** (2009): Untersuchungen zum Einfluss von bFGF auf die Retinogenese des Huhns in einem dreidimensionalen *in vitro* Zellkultursystem. *Doktorarbeit*
- Fuijsawa, H.** (1973): The process of reconstruction of histological architecture from dissociated retinal cells. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **171**: 312-330.
- Ghai, K., Stanke, J.J., Fischer, A.J.** (2008): Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain Research* **1192**: 76-89.
- Godinho, L., Mumm, J.S., Williams, P.R., Schroeter, E.H., Koerber, A., Park, S.W., Leach, S.D., Wong, R.O.** (2005): Targeting of amacrine cell neurites to appropriate synaptic laminae in the developing zebrafish retina. *Development* **132**(22): 5069-79.

Guo, L., Salt, T.E., Maass, A., Luong, V., Moss, S.E., Fitzke, F.W., Cordeiro, M.F. (2006): Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* **47**(2):626-33.

Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*; **88**:49–92 .

Hyndman, A.G., Adler, R. (1981): Analysis of glutamate uptake and monosodium glutamate toxicity in neural retina monolayer cultures. *Brain Research* **254**(2): 303-14.

James, J., Das, A.V., Bhattacharya, S., Chacko, D. M., Zhao, X., Ahmad, I. (2003): In vitro generation of early born neurons from late retinal progenitors. *Journal of Neuroscience* **23**: 8193-203.

Johnson, P.T., Williams, R.R., Cusato, K., Reese, B.E. (1999): Rods and cones project to the inner plexiform layer during development. *Journal of Comparative Neurology* **414**(1): 1-12

Johnson, P.T., Raven, M.A., Reese, B.E. (2001): Disruption of transient photoreceptor targeting within the inner plexiform layer following early ablation of cholinergic amacrine cells in the ferret. *Visual neuroscience* **18**(5): 741-51.

Karnovsky, M.J., Roots, A. (1964): A direct coloring thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem.cytochem.* **12**: 219-221.

Kocaeli, H., Korfali, E., Oztürk, H., Kahveci N., Yilmazlar, S. (2007): MK 801 improves neurological and histological outcomes after spinal cord ischemia induced by transient aortic cross-clipping in rats. *Surgical Neurology*, **V.64**.

Laube, B., Kuhse, J., Betz, H. (1998): Evidence for a Tetrameric Structure of Recombinant NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience* **18**(8): 2954-2961

Layer, P.G., Sporns, O. (1987): Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**(1): 284-8.

Layer, P.G., Willbold, E. (1989): Embryonic chicken retinal cells can regenerate all cell layers in vitro, but ciliary pigmented cells induce their correct polarity. *Cell Tissue Research* **258**: 233-242.

Layer, P.G., Vollmer, G. (1982): Lucifer yellow stains displaced amacrine cells of the chicken retina during embryonic development. *Neuroscience letters* **31**(2): 99-104

Layer, P.G., Willbold, E. (1994): Regeneration of the avian retina by retinospheroid technology. *Progress in retinal and eye research*, Vol.**13**, No.1.

Layer, P. G., Rothermel A. (2001): From stem cells towards neural layers: a lesson from re-aggregated embryonic retinal cells. *Neuroreport* **12**(7): A39-46.

Layer, P.G., Robitzki, A. A., Rothermel, A., Willbold, E. (2002): Of layers and spheres: the aggregate approach in tissue engineering. *Trends in Neuroscience* **25**: 131-134.

Linden, R., Martins, R.A., Silveira, M.S. (2005): Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina. *Progress in Retinal Eye Research* **24**: 457-91.

- Lucas, D.R., Newhouse, J.P.** (1957): The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *A.M.A. archives of ophthalmology* **58**(2): 193-201.
- Luk, K.C., Kennedy, T.E., Sadikot, A.F.** (2003): Glutamate promotes proliferation of Striatal Neuronal Progenitors by an NMDA Receptor-Mediated Mechanism. *Journal of Neuroscience* **23**(6): 2239-2250.
- Manent, J.B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C.; Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., Represa, A.** (2005): A noncanonical release of GABA and Glutamate modulates neuronal migration. *Journal of Neuroscience* **25**(19): 4755-4765.
- Martins, R.A.P., Linden, R., Dyer, M.A.** (2006): Glutamate regulates retinal progenitors cells proliferation during development. *European Journal of Neuroscience* **24**: 969-980.
- Martins, R.A.P., Pearson, R.A.** (2008): Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Research* **1192**: 37– 60.
- Martins, R.A., Silveira, M.S., Curado, M.R., Police A.I., Linden. R.** (2005): NMDA receptor activation modulates programmed cell death during early post-natal retinal development: a BDNF-dependent mechanism *Journal of Neurochemistry* **95**(1): 244-253.
- Mey, J, Thanos, S.** (1992): Development of the visual system of the chick - a review. *Journal für Hirnforschung* **33**(6): 673-702.
- Milam A. H., De Leeuw, A.M., Gaur, V.P., Saari, J.C.** (1990): Immunolocalization of cellular retinoic acid binding protein to Muller cells and/or a subpopulation of GABA-positive amacrine cells in retinas of different species. *Journal of Comparative Neurology* **296**: 123-129.
- Millar T., Ishimoto I., Johnson C.D., Epstein M.L., Chubb I.W., Morgan I.G.** (1985): Cholinergic and acetylcholinesterase-containing neurons of the chicken retina. *Neuroscience letters* **61**(3):311-6.
- Morgan, J., Wong, R.** (2005): Development of cell types and synaptic connections in the retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Moscona, A.A.** (1952): Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Experimental Cell Research* **3**: 535-639.
- Moscona, A.A.** (1956): Development of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **92**(2): 410-6.
- Moscona, A.A.** (1962): Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. *Experimental Cell Research* **22**: 455-475.
- Moshiri, A., Close, J., Reh, T.A.** (2004): Retinal stem cells and regeneration. *International Journal of Developmental Biology* **48**(8-9): 1003-14.
- Mukhin A.G., Ivanova, S.A., Knoblach, S.M., Faden, A.I.** (1997): New in vitro model of traumatic neuronal injury: Evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Neurotrauma* **14** (9):651-663.
- Olney, J.W.** (1978): Neurotoxicity of excitatory amino acids. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In: E. McGeer, J. W. Olney, & P. L. McGeer (Eds.): *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*, pp. 95-121, Raven Press, New York.

Olney, J.W. (1982): The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina* **2**: 341-359.

Olney, J., Price, M., Salles, K.S., Labruyere, J., Friedrich G. (1987): MK-801 powerfully protects against N-methyl aspartate neurotoxicity. *European journal of pharmacology* **23**;141(3): 357-61.

Olney, J.W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T. Sesma, M.A. (1991): NMDA antagonist neurotoxicity: Mechanism and prevention. *Science* **254**: 1515-1518.

Prada, C., Puga, J., Perez-Mendez, L., Lopez, A.R., Ramirez, G. (1991): Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *European Journal of Neuroscience* **3** (6):559-569.

Prada, F.A, Quesada A., Dorado, M.E., Chmielewski C, Prada C. (1998): Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* **22**(3): 221-36.

Prada, F., Medina J.I., Lopez-Gallardo, R., Quesada, A., Spira, A., Prada, C. (1999): Spatiotemporal Gradients of Differentiation of Chick Retina Types I and II Cholinergic Cells: Identification of a Common Postmitotic Cell Population. *Journal of Comparative Neurology* **410**: 457-466.

Rakic, P., Komuro, H. (1995): The role of receptor/channel activity in neuronal cell migration. *Journal of Neurobiology* **26**: 299–315.

Ramirez, M., Lamas, M. (2009): NMDA receptor mediates proliferation and CREB phosphorylation in postnatal Müller glia-derived retinal progenitors. *Molecular Vision* **15**: 713-21.

Reese, B.E. (2004): Developmental plasticity of photoreceptors. *Progress in Brain Research* **144**: 3-19.

Reese, B.E. (2010): Development of the retina and optic pathway. *Vision Research* **50**: doi: 10.1016/j.visres.2010.07.010.

Reese, B.E, Raven, M.A., Giannotti, K.A., Johnson, P.T. (2001): Development of cholinergic amacrine cell stratification in the ferret retina and the effects of early excitotoxic ablation. *Visual Neuroscience* **18**(4): 559-70.

Reif-Lehrer, L., Bergenthal, J., Hanninen, L. (1975): Effects of monosodium glutamate on chick embryo retina in culture. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **14**: 114-124.

Reichenbach, A., Robinson,S. (1995): Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Progress in retinal and eye research* **15**: 138-171

Rodieck, R.,W. (1989): Starburst amacrine cells of the primate retina. *Journal of comparative neurology* **285**(1): 18-37

Romano, C., Chen, Q., Olney, J.W. (1998): The intact isolated (ex vivo) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Progress in Retinal and Eye Research* **17**:(4): 465-83.

Rossi, D.J., Slater, N.T. (1993): The developmental onset of NMDA receptor- channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* **32**: 1239– 1248.

Rothermel, A. (2000): Die Retinosphäroidtechnologie als Modellsystem der Retinogenese: Der Einfluß von Müller- und Pigmentepithelzellen auf die Schichtenbildung und die Photorezeptorendifferenzierung in der Retina des Huhns. *Doktorarbeit*, TU Darmstadt

Rothermel, A., Layer, P.G. (2003): GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **44**(5): 2221-8.

Sattler, R., Tymianski, M. (2001): Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular Neurobiology* **24**(1-3): 107-29.

Spira A.W., Millar T.J., Ishimoto I., Epstein M.L., Johnson C.D., Dahl J.L., Morgan I.G., (1987): Localization of choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the embryonic chick retina. *The Journal of comparative neurology*. **260** (4):526-38.

Stanke, J.J., Lehman, B., Fischer, A.J. (2008): Muscarinic signaling influences the patterning and phenotype of cholinergic amacrine cells in the developing chick retina. *BMC Developmental Biology* **8** (13): 10.1186/1471-213X-8-13.

Stanke J.J. Fischer A.J. (2010): Embryonic retinal cells and support to mature retinal neurons. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **51**(4): 2208-18.

Suzuki, M., Nelson, A., Eickstaedt, J., Wallace, K., Wright, L., Svendsen, C. (2006): Glutamate enhances proliferation and neurogenesis in human neural progenitor cell cultures derived from the fetal cortex. *European Journal of Neuroscience* **24**: 645-653.

Thanos, S., Mey, J. (2001): Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Research Reviews* **35**(3): 205-45.

Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J., Cho, K., Trevino, S., Matsuda, T., Chen, D. (2008): Alpha-Aminoadipate Induces Progenitor Cell Properties of Müller Glia in Adult Mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **49** (3): 1142-1150.

Tsim, K. W., Randal, W.R., Bernard, E.A. (1988): Monoclonal antibodies specific for the different subunits of asymmetric acetylcholinesterase from chick muscle. *Journal of Neurochemistry* **51**(1): 95-104.

Turner, D.L., Cepko, C.L. (1987): A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late development. *Nature* **328**(6126): 131-6.

Uchida, N., Kiuchi, Y., Mivamoto, K., Uchida, J., Tobe, T., Tomita, M., Shioda, S., Nakai, Y., Koide, R., Oguchi, K. (1998): Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *European Journal of Pharmacology* **343**(2-3): 265-73.

Voglis, G., Tavernarakis, N. (2006): The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO reports* **7**(11): 1104–1110.

Vollmer, G., Layer, P.G., Gierer, A. (1984): Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification. *Neuroscience Letters* **48**: 191-196.

Wahlin, K., Moreira, E., Huang, H., Yu, N., Adler, R. (2008): Molecular Dynamics of Photoreceptor Synapse Formation in the Developing Chick Retina. *Journal of Comparative Neurology* **506**: 822-837.

Wang, Y., Qin Z.H. (2010): Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* **15** (11):1382-402.

- Willbold, E., Reinicke, M., Lance-Jones, C., Lagenaur, C., Lemmon, V., Layer, P.G.** (1995): Müller glia stabilizes cell columns during retinal development: lateral cell migration but not neuropil growth is inhibited in mixed chick-quail retinospheroids. *The European journal of neuroscience* **7**(11): 2277-84.
- Willbold, E., Berger, J., Reinicke, M., Wolburg, H.** (1997): On the role of Müller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *Journal für Hirnforschung* **38**(3): 383-96.
- Williams, R.R., Cusato, K., Raven, M., Reese, B.E.** (2001): Organization of the inner retina following early elimination of the retinal ganglion cell population: Effects on cell numbers and stratification patterns. *Visual Neuroscience* **18**: 233–244.
- Wong R.O.** (1995): Cholinergic regulation of $[Ca^{2+}]_i$ during cell division and differentiation in the mammalian retina. *Journal of Neuroscience* **15**(4):2696-706.
- Wong, R.O.L., Collin, S.P.** (1989): Dendritic maturation of displaced putative cholinergic amacrine cells in the rabbit retina. *Journal of Comparative Neurology* **287**: 164–178.
- Wong, R.O.L., Chernjavsky, A., Smith, S.J. & Shatz, C.J.** (1995): Early functional neural networks in the developing retina. *Nature* **374**: 716–718.
- Yamagata, K., Goto, K., Kuo, CH., Kondo, H., Miki, N.** (1990): Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cones cells. *Neuron* **4**(3):469-76.
- Yamagata, M., Sanes, J.R.** (2008): Dscam and sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature* **451** (7177): 465-9.
- Yang, X.L.** (2004): Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Progress in Neurobiology* **73**: 127–150.
- Zeevalk, G.D., Nicklas, W.J.** (1990): Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **253**(3):1285-92.
- Zeevalk, G.D., Nicklas, W.J.** (1993): Hypothermia, metabolic stress, and NMDA-mediated excitotoxicity. *Journal of neurochemistry* **61**(4):1445-53.
- Zhou, Z.J.** (1998): Direct participation of starburst amacrine cells inspontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *Journal of Neuroscience* **18**: 4155–4165.
- Zorumski, C.F., Yamada, K.A., Price, M.T., Olney, J.W.** (1993): A benzodiazepine recognition site associated with the non-NMDA glutamate receptor. *Neuron* **10**(1):61-7.

Lebenslauf

Gesine Bachmann

geboren am 9.8.1962 in Tübingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Kinder: Alina Zoe 1990, Noemi Felice 1993, Liam Frederik 1999.

Schulbildung:

- | | |
|------------|--|
| 1969-973 | Christliche Gemeinschaftsschule Bad Urach |
| 1973-1982 | Graf-Eberhard-Gymnasium Bad Urach |
| 1982/1983: | Freiwilliges Soziales Jahr beim Internationalen Bund für Sozialarbeit in der Nervenlinik Tübingen. |

Studium:

- | | |
|------------|--|
| 1983-1989: | Biologiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Abschluss Diplom-Biologin) |
| 1989: | Diplomarbeit am Anatomischen Institut Tübingen bei Prof. Dr. U. Drews zum Thema: Histochemischer Nachweis der embryonalen Cholinesterase in der Gonadenentwicklung des Hühnerembryos. |
| 1990/1991: | Zeichnerin am Anatomischen Institut Tübingen |
| ab 1992: | Selbständige Mitarbeit als wissenschaftliche Zeichnerin (Taschenatlas der Embryologie/Thieme Verlag, Beck Verlag)

Kindererziehung |
| 1999-2001: | Wissenschaftliche Mitarbeiterin TU Darmstadt /Biologie (mit Erziehungsurlaub vom 14.10.1999 bis 29.1.2001) |
| seit 2002: | Arbeitsgruppe Prof. Dr. P.G.Layer Fachbereich Biologie, Dissertationsthema: Die Bedeutung der inneren plexiformen Schicht (IPL) in der Retinogenese: Glutamatbehandlung von Rosettensphäroiden“. |

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den

Gesine Bachmann